

Estudo da Permeabilidade da TX5 em Caco-2 e RBE4 – um potencial indutor/ativador da Glicoproteína-P

Tese do 2º ciclo do Mestrado em Toxicologia Analítica, Clínica e Forense

Trabalho realizado sob a orientação do Professor Doutor Fernando Remião e co-orientação
da Doutora Filipa Ponte e da Doutora Renata Silva

André Monteiro Martins Monjardim Quelhas

Outubro de 2015

É autorizada a reprodução integral desta dissertação apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que tal se compromete.

A dissertação apresentada visa a obtenção do grau de mestre tendo sido escrita segundo o novo acordo ortográfico.

“Aquele que não tem coragem suficiente para aceitar riscos,
não irá conquistar nada na vida”

Muhammad Ali

AGRADECIMENTOS

A parte experimental deste trabalho foi realizada no laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e só foi possível graças ao apoio e contínuo acompanhamento que tive desde o início desta etapa. A todos que me ajudaram um muito obrigado:

- À professora Doutora Maria de Lourdes Bastos, pela magnífica orientação de todo o curso de Mestrado em Toxicologia Analítica, Clínica e Forense;
- Ao professor Doutor Fernando Remião, orientador desta tese, pelo seu contínuo acompanhamento, disponibilidade, orientação, total colaboração e preocupação ao longo de toda esta etapa;
- À Doutora Ana Filipa Ponte pelo seu grande apoio, acompanhamento e muita paciência. Apesar do curto espaço de tempo para realizar o trabalho, conseguiu ensinar-me todas as técnicas necessárias para realizar a atividade experimental. Só posso desejar que o futuro lhe reserve o melhor e que tenha sucesso em todos os desafios da sua carreira;
- À Doutora Renata Silva, pela grande simpatia, boa disposição e apoio ao longo de todo o trabalho. Sempre que foi necessário tirar alguma dúvida ou ajuda em qualquer procedimento experimental, mostrou-se sempre muito prestável e disponível.
- A todo o pessoal do departamento de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto que sempre se disponibilizou para ajudar em qualquer problema que encontrei ao longo de todo o trabalho.
- Agradeço às Técnicas do Laboratório de Toxicologia, Cátia e Margarida, por todo o apoio durante o meu trabalho e claro pela sua contínua boa disposição.
- Agradeço também aos restantes colegas de trabalho e estudantes de Doutoramento e Pós Doutoramento por todo o apoio ao longo desta etapa e aproveito para lhes desejar o maior sucesso durante nas suas carreiras;
- A todo o pessoal do departamento de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, à Sr^a Eng^a Maria Elisa Soares, Doutora Helena Carmo, Doutora Paula Guedes, Doutora Vera Costa e Doutor João Capela e a todos os restantes colaboradores deste mestrado;
- Agradeço muito sinceramente e com muito orgulho à minha mãe, pai e irmão por todos os conselhos e por toda ajuda que sempre se disponibilizaram a dar ao longo deste percurso.
- Por fim, agradeço à Sofia Telinhos por todo o apoio, motivação e carinho que teve comigo ao longo desta fase.

Resumo

A Glicoproteína-P (P-gp) é um transportador membranar que pertence à família de transportadores adenosina trifosfato *binding cassette* (ABC). Inicialmente considerava-se que este transportador seria responsável pela resistência a múltiplos fármacos (MDR) em células cancerígenas pois impedia a entrada de fármacos nas células devido ao seu mecanismo de efluxo. No entanto, após vários estudos foi possível verificar que este transportador funciona como barreira fisiológica e que está presente numa grande variedade de células de diversos tecidos, como intestino, fígado, rins, barreira hematoencefálica (BHE), testículo, entre outros. Assim sendo, a P-gp desempenha um papel importantíssimo de proteção do organismo realizando o efluxo de diversos compostos, evitando potenciais situações de toxicidade celular.

O estudo da indução/ativação ou inibição da P-gp ou de outros transportadores é importante para combater fenómenos de toxicidade ou para aumentar/melhorar o efeito terapêutico de alguns compostos.

Este trabalho teve como objetivo o estudo de um indutor/ativador, do grupo das tioxantonas (TXs), mais concretamente a TX5. Neste trabalho foi avaliada a citotoxicidade e a capacidade deste composto atravessar as barreiras biológicas avaliando-se a sua permeabilidade através de monocamadas de células Caco-2 e RBE4, que mimetizam as características da barreira intestinal humana e da BHE de rato, respetivamente. Este composto é capaz de aumentar a atividade e induzir a expressão desta proteína de transporte e, desta forma, poderá funcionar como potencial antídoto a ser utilizado em situações de intoxicação por substratos da P-gp.

No presente trabalho foi possível:

- Avaliar a citotoxicidade da TX5 nas células RBE4 e Caco-2, em diferentes concentrações, 8 e 24 horas após exposição, respetivamente. Verificou-se que, pelo ensaio de redução do MTT e o ensaio de incorporação do NR, este composto não é citotóxico nas duas linhas celulares utilizadas;

- Avaliar a capacidade da TX5 para atravessar monocamadas íntegras de células Caco-2 e células RBE4. Foram efetuados ensaios de permeabilidade nas duas linhas celulares e foi determinada a quantidade de TX5 presente a nível basolateral ao longo de 8 horas de incubação com TX5 20 μ M na porção apical. No final do ensaio foi igualmente quantificada a quantidade intracelular de TX5, assim como a quantidade de TX5 remanescente na porção apical. Verificou-se, deste modo, a reduzida capacidade da TX5 para atravessar as monocamadas de células Caco-2 e RBE4, demonstrando a sua potencialmente reduzida permeabilidade ao nível intestinal e da BHE.
- Desenvolver uma metodologia para extração, análise e quantificação da TX5 nas amostras recolhidas nos ensaios de avaliação da permeabilidade do derivado tioxantónico. Vários parâmetros foram otimizados, tais como: a seleção e definição da concentração de padrão interno, a metodologia de extração do analito, a composição e o fluxo da fase móvel a ser utilizada no sistema de UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*), , assim como as condições de deteção no espetrómetro de massas (condições de ionização e de fragmentação). A fase móvel escolhida é constituída por 95 % de metanol e 5% de água, com acetato de amónio 5 mM, sendo o equipamento operado em modo isocrático a um fluxo 0,4 mL/min. Nestas condições cromatográficas é possível obter uma excelente resolução dos picos cromatográficos da TX5 e do padrão interno, a TX4, assim como a sua eficiente separação num curto intervalo de tempo de corrida. Foi desenvolvida e aperfeiçoada uma metodologia de extração da TX5 com acetato de etilo que permite obter um excelente rendimento extrativo, rendimento esse idêntico ao obtido para a TX4, comprovando a utilidade e aplicabilidade da utilização da TX4 como padrão interno. No que diz respeito à linearidade, nas condições otimizadas de extração e análise/deteção da TX5 e da TX4 por LC-MS/MS, foi possível verificar a existência de uma correlação linear entre a concentração de TX5 e a razão entre o sinal analítico da TX5 e o sinal analítico da TX4 numa gama de concentrações entre 0,005 – 10 μ M de TX5.

Com os resultados obtidos foi, assim, possível concluir que a TX5 não provoca citotoxicidade tanto nas células RBE4 como nas células Caco-2. Posteriormente, nos ensaios de permeabilidade verificou-se que apenas 8 horas após o início dos estudos é que a TX5 foi detetada e quantificada na porção basolateral das monocamadas celulares. Nestes estudos foi observado também que os níveis intracelulares de TX5 na linha celular RBE4 são muito superiores aos níveis intracelulares na linha celular Caco-2, embora representem, em ambos os casos, uma reduzida percentagem da quantidade de TX5 detetada a nível apical.

Verificou-se também que, em ambas as linhas celulares, os níveis basolaterais de TX5 são muito reduzidos, indicando assim a baixa permeabilidade deste derivado tioxantónico e, consequentemente, a sua reduzida absorção

Palavras-chave: Glicoproteína-P, Indutor, Células Caco-2, Células RBE4, TX5.

Abstract

The P-glycoprotein is a membrane transporter that belongs to the adenosine triphosphate binding cassette (ABC) family of transporters. Firstly it was considered that this transporter was responsible for the multidrug resistance (MDR) in cancer cells because prevent the entry of drugs on the cells due to its efflux mechanism. Nonetheless after several studies it was possible to verify that this transporter works as a physiological barrier and it is present on a great variability of cells as intestine, liver, kidneys, Blood Brain Barrier (BBB), testis, among others.

Therefore P-gp plays an important role on the protection of the organism performing the efflux compounds avoiding thus situations of cellular toxicity.

The study of the induction/activation or inhibition of the P-gp or other transporters it is important to combat phenomenon's of toxicity or to increase/improve the therapeutics of some compounds.

This aim of this work was to study of an inductor/activator, of the group of thioxanthenes (TXs), specifically the TX5. In this work it was evaluated the cytotoxicity and the ability of this compound to pass across the biological barriers, evaluating his permeability through monolayer cell lines, Caco-2 and RBE4 that have the same characteristics as the Human Intestinal Barrier and the BBB from rat, respectively.

This compound is capable of increase the activity and induces the transport protein expression and so, it may work as an antidote in cases of poisoning by P-gp substrates.

In the present work it was possible:

- To evaluate the TX5 cytotoxicity on RBE4 and Caco-2 cell line, in different concentrations, during a time of exposition of 8 and 24 hours respectively. It was found through the MTT reduction assay and the NR incorporation test that this compound it is not cytotoxic on both cell lines used;
- To study the ability of the TX5 to cross integral monolayers of Caco-2 cells and RBE4 cells. There were performed permeability assays on both cell lines and it was determined the amount of TX5 present at basolateral level during 8 hours of incubation with TX5 20 μ M at the apical portion. At the end of the assay it was equally quantified the intracellular quantity of TX5, as the quantity of the remaining TX5 at the apical portion. This way it was found the reduced capacity of the TX5 to cross the monolayers of Caco-2 and RBE4 cells, showing his potentially reduced permeability at the intestine and BBB level.

- To develop a methodology for TX5 extraction, analysis and quantification on the collected samples during the permeability evaluation assays of the thioxanthonic derivative. Several parameters were optimized, such as, the selection and definition of the intern pattern concentration, the analyte methodology of extraction, the composition and mobile flux phase to be used on the UPLC system (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) as well as the detection conditions on the mass spectrometer (ionization and fragmentation conditions). The mobile phase consists of 95% methanol and 5% water, with ammonium acetate 5mM, being the equipment operated on a isocratic way with a flux 0,4 mL/min. Under these chromatographic conditions it is possible to obtain an excellent resolution of the chromatographic peaks of the TX5 and the intern pattern, TX4, as well as an efficient separation on a short time period. It was developed and improved an extraction methodology of TX5 with ethyl acetate that allows to obtain an excellent extractive yield, that is identical to the obtained for the TX4, proving the utility and the applicability of the used of TX4 as intern pattern. Regarding to linearity, under the optimized conditions of extraction and analysis/detection of TX5 and TX4 by LC-MS/MS, it was possible to verify the existence of a linear correlation between the TX5 concentration and the ratio between the analytical signal of TX5 and the analytical signal of TX4 on a range of concentration among 0,005 – 10 uM de TX5.

With the obtained results it can be concluded that TX5 does not cause cytotoxicity in RBE4 cell line as well as in Caco-2 cell line. After that, on the permeability assays it was verified that only from the eighth hour the TX5 was detected and quantified on the basolateral portion. Through this study it was also observed that the intracellular levels of TX5 on the RBE4 cell line are much higher than the intracellular levels on the Caco-2 cell line, although represent on both cases a reduced percentage of the TX5 quantity detected at apical level.

It was also verified that, in both cell lines the TX5 basolateral levels are very reduced, thus indicating the low permeability of this thioxanthonic derivative and consequently his reduced absorption.

Keywords: P-Glycoprotein, Inductor, Caco-2 cells, RBE4 cells, TX5.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xxvii
ENQUADRAMENTO DO TRABALHO	xxviii
ABREVIATURAS	xxx
1. Transportadores Membranares.....	33
2. ABC transporters.....	35
2.1 Transportadores MRP	36
2.2 Transportadores ABCG.....	38
2.3 Glicoproteína-P.....	39
2.3.1 Estrutura da P-gp.....	40
2.3.2 Localização da P-gp.....	41
2.3.3 Mecanismo de transporte da P-gp.....	44
2.3.4 Substratos P-gp	45
2.3.5 Inibidores P-gp.....	46
2.3.6 Indutores P-gp.....	49
2.3.7 Interação P-gp.....	50
2.3.8 Polimorfismo P-gp	57
3. Intestino – Introdução	58
3.1 Epitélio intestinal	60
3.2 Permeabilidade do Intestino.....	63
3.3 Transportadores no intestino delgado	64
3.3.1 Transportadores SLC.....	64
3.3.2 Transportadores ABC	65
3.4 Transporte mediado por P-gp	66
3.4.1 Sobreposição CYP3A4 e P-gp	68
3.5 Transporte Mediado pela BCRP.....	74
3.6 Transporte mediado pelo MRP2.....	74
4. Barreira Hematoencefálica – Introdução	76
4.1 Barreira sangue – fluido cerebrospinal.....	78
4.2 Transportadores a nível da BHE	81
4.2.1 Transportadores ABC	83
4.3 P-gp.....	84

4.4 MRP	86
4.4.1 MRP1	88
4.5 BCRP (ABCG2)	89
4.6 Outros transportadores na BHE	90
5. Linhas Celulares <i>in Vitro</i>	91
5.1 Linha celular Caco-2	91
5.2 Linha celular RBE4	93
6. Xantonas e Tioxantonas	95
7. Objetivos do Trabalho	102
8. Materiais e Métodos	107
8.1 Síntese da Tioxantona 5 (TX5) e da Tioxantona 4 (TX4)	107
8.2 Cultura Celular	108
8.2.1 Sementeira de células Caco-2 em placa de 96 poços	108
8.2.2 Sementeira de células RBE4 em placa de 96 poços	110
8.3 Avaliação da Citotoxicidade da TX5	111
8.3.1 Exposição das Caco-2 à TX5	111
8.3.2 Exposição das RBE4 à TX5	112
8.3.3 Estudos de Viabilidade Celular	114
8.4 Avaliação da Permeabilidade da TX5	116
8.4.1 Cultura de células Caco-2 em <i>inserts</i>	116
8.4.2 Cultura de células RBE4 em <i>inserts</i>	118
8.5 Medição da Resistência Elétrica Transepitelial (TEER, <i>Transepithelial Electrical Resistance</i>)	120
8.6 Exposição das monocamadas de células Caco-2 e RBE4 à TX5 – avaliação da permeabilidade do composto numa monocamada celular íntegra	122
8.7 Desenvolvimento de uma metodologia para análise e quantificação da TX5	123
8.7.1 Otimização das condições cromatográficas e de deteção no detetor de massa	123
8.7.2 Desenvolvimento de uma metodologia para extração da TX5 das amostras de HBSS recolhidas nos estudos de permeabilidade	126
8.7.3 Extração da TX5 Intracelular	134
8.7.4 Quantificação do teor de Proteína das Amostras	136
8.7.5 Ensaaios de Linearidade	137
8.7.6 Avaliação da linearidade de resposta do detetor e seleção da concentração ideal de padrão interno	139
8.8. Análise Estatística	141

9. Resultados e Discussão.....	145
9.1 Estudo da citotoxicidade da TX5 em células Caco-2 e RBE4 – Ensaio da redução do MTT e ensaio da incorporação do vermelho neutro.....	145
9.1.1 Células Caco-2.....	145
9.1.2 Células RBE4	147
9.2 Desenvolvimento de uma metodologia para análise e quantificação da TX5.....	149
9.2.1 Otimização das condições cromatográficas e de deteção no detetor de massas	149
9.2.2 Desenvolvimento de uma metodologia para extração da TX5 das amostras de HBSS recolhidas nos estudos de permeabilidade	181
9.2.3 Ensaio de Linearidade	189
9.3 Avaliação da Permeabilidade da TX5.....	193
9.3.1 Níveis basolaterais de TX5	194
9.3.2 Níveis intracelulares de TX5	197
10. Conclusões.....	205
11.Referências Bibliográficas	210

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Nomenclatura dos transportadores ABC. Adaptado de (Committee , Dean and Annilo 2005).	36
Figura 2 - Estrutura da P-gp. Adaptado de (Couture, Nash et al. 2006).	41
Figura 3 - Biópsia duodenal antes (A) e 9 dias após (B) a administração de rifampina. Adaptado de (Greiner, Eichelbaum et al. 1999).	52
Figura 4 – Fatores que influenciam a absorção oral de compostos e a biodisponibilidade. Adaptado de (Engman 2003)	60
Figura 5 – Vias de permeabilidade intestinal. Adaptado de (Groschwitz and Hogan 2009).	61
Figura 6 – Complexo de junções epiteliais intestinais. Adaptado de (Groschwitz and Hogan 2009).	63
Figura 7 – Ciclo do substrato da P-gp e CYP3A4 e potencial para o transportador controlar o acesso à enzima. Adaptado de (Benet and Cummins 2001).	70
Figura 8 – Efeitos potenciais do efluxo da P-gp no acesso a fármacos pela CYP3A4. Adaptado de (Benet and Cummins 2001).	71
Figura 9 – Barreira cerebrospinal e transportadores presentes no plexo coróide. Adaptado de (Girardin 2006).	78
Figura 10 – Distribuição dos transportadores presentes na BHE. Adaptado de (Miller 2010).	82
Figura 11 - Estrutura química das Tioxantonas. Adaptado de (Silva, Palmeira et al. 2015).	98
Figura 12 – Estrutura química da TX4 e TX5.	107
Figura 13 – Representação esquemática do processo de sementeira das células Caco-2 e RBE4 em <i>inserts</i> .	118
Figura 14 — Representação esquemática da medição do valor de TEER.	121
Figura 15 - Procedimento realizado para a seleção do solvente orgânico.	127
Figura 16 - Procedimento realizado para a seleção do solvente orgânico e para a avaliação do efeito do pH e do número de extrações sequenciais no rendimento extrativo da TX5.	128
Figura 17 – Procedimento realizado para a avaliação do efeito da temperatura no rendimento extrativo da TX5.	129
Figura 18 – Procedimento realizado para a avaliação do rendimento extrativo da TX5 e da TX4.	131
Figura 19 – Procedimento realizado para a avaliação do rendimento extrativo da TX5 e da TX4, em diferentes concentrações.	133

Figura 20 – Protocolo para extração da TX5 Intracelular	135
Figura 21 – Representação da preparação de padrões TX5 em HBSS (+/+).	138
Figura 22 – Esquema do ensaio de linearidade	140
Figura 23 – Citotoxicidade da TX5 (0 – 100.0 μ M) em células Caco-2, 24 h após exposição, avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados estão expressos como media \pm SD de 5 experiências independentes (realizadas em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo Bonferroni's multiple comparisons <i>post hoc</i> test.	145
Figura 24 – Citotoxicidade da TX5 (0 – 100.0 μ M) em células Caco-2, 24 h após exposição, avaliada pelo ensaio de incorporação do NR. Os resultados estão expressos como media \pm SD de 5 experiências independentes (realizadas em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo Bonferroni's multiple comparisons <i>post hoc</i> test.	146
Figura 25 – Citotoxicidade do TX5 (0, 10 e 20 μ M) em células RBE4, 8 h após exposição, avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados estão expressos como média \pm SD de 6 experiências independentes (realizadas em sextuplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo Bonferroni's multiple comparisons <i>post hoc</i> test.	147
Figura 26 – Citotoxicidade do TX5 (0, 10 e 20 μ M) em células RBE4, 8 h após exposição, avaliada pelo ensaio de incorporação do NR. Os resultados estão expressos como media \pm SD de 3 experiências independentes (realizadas em sextuplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo Bonferroni's multiple comparisons <i>post hoc</i> test.	148
Figura 27 – Ilustração gráfica do ajuste e seleção da voltagem de cone que permitiu a obtenção de uma sinal analítico com maior intensidade para o ião molecular da TX5. Ião $[M+H]^+ = 328$ m/z. A – voltagem de cone: 40 V; B – voltagem de cone: 35 V; C – voltagem de cone: 45 V.	150
Figura 28 - Ilustração gráfica do ajuste e seleção da voltagem de cone que permitiu a obtenção de uma sinal analítico com maior intensidade para o ião molecular da TX4. Ião $[M+H]^+ = 342$ m/z. A – voltagem de cone: 40 V; B – voltagem de cone: 35 V; C – voltagem de cone: 45 V.	150
Figura 29 – Espectro de massas da TX5 obtido por infusão direta de 10uM de TX5 (20 μ L/min). O espectro foi obtido com uma voltagem de cone de 40 V e com uma energia de colisão A: 25 eV, B: 27 eV, C: 22 eV. É possível visualizar dois iões produto maioritários da TX5, os iões 244 e 286 (m/z), assim como o ião precursor [ião 328 (m/z)].	152
Figura 30 – Locais de fragmentação principais da TX5 e da TX4	153

Figura 31 – Espectro de massas da TX4 obtido por infusão direta de 10uM de TX4 (20 μ L/min). O espectro foi obtido com uma voltagem de cone de 40 V e com uma energia de colisão A: 27 eV, B: 25 eV, C: 28 eV. É possível visualizar dois iões produto maioritários da TX5, os iões 244 e 286 (m/z), assim como o ião precursor [ião 342 (m/z)]......	154
Figura 32 – Cromatograma obtido após injeção no LC-MS/MS de 10 μ L de TX5 10 μ M (A) e 10 μ L de TX4 10 μ M (B), utilizando uma fase móvel constituída por 10% de solvente A (água) + 90% de solvente B (metanol), com acetato de amónio 5 mM, a um fluxo de 0,3 mL/min. Os cromatogramas estão ilustrados em modo TIC (<i>total ion current</i>), representando a soma da intensidade das massas a serem detetadas, ou seja, a soma da intensidade dos sinais analíticos dos iões produto 244 e 286 (m/z).....	156
Figura 33 – Cromatograma obtido após injeção no LC-MS/MS de 10 μ L de TX5 10 μ M (A) e 10 μ L de TX4 10 μ M (B), utilizando uma fase móvel constituída por 5 % de solvente A (água) + 95 % de solvente B (metanol), com acetato de amónio 5 mM, a um fluxo de 0,3 mL/min. Os cromatogramas estão ilustrados em modo TIC (<i>total ion current</i>), representando a soma da intensidade das massas a serem detetadas, ou seja, a soma da intensidade dos sinais analíticos dos iões produto 244 e 286 (m/z).....	157
Figura 34 – Cromatograma obtido após injeção no LC-MS/MS de 10 μ L de TX5 10 μ M (A) e 10 μ L de TX4 10 μ M (B), utilizando uma fase móvel constituída por 5 % de solvente A (água) + 95 % de solvente B (metanol), com acetato de amónio 5 mM, a um fluxo de 0,4 mL/min. Os cromatogramas estão ilustrados em modo TIC (<i>total ion current</i>), representando a soma da intensidade das massas a serem detetadas, ou seja, a soma da intensidade dos sinais analíticos dos iões produto 244 e 286 (m/z).....	158
Figura 35 – Cromatograma obtido após injeção no LC-MS/MS de 10 μ L de uma mistura de TX5 e TX4 na concentração de 5 μ M, utilizando uma fase móvel constituída por 5 % de solvente A (água) + 95 % de solvente B (metanol), com acetato de amónio 5 mM, a um fluxo de 0,4 mL/min. Os cromatogramas estão ilustrados em modo TIC (<i>total ion current</i>), representando a soma da intensidade das massas a serem detetadas, ou seja, a soma da intensidade dos sinais analíticos dos iões produto 244 e 286 (m/z) de cada ião precursor.	159
Figura 36 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A deteção foi efetuada com uma voltagem de cone de 40 V e com uma energia de colisão 25 eV. A – Cromatograma obtido em modo TIC (sinal analítico corresponde à soma dos sinais detetados para os fragmentos 244 e 286 m/z da TX5. B – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 8,66e5). C – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,26e6).	161

- Figura 37 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 42 V e com uma energia de colisão 25 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 8,90e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,14e6). 162
- Figura 38 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 38 V e com uma energia de colisão 25 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,02e6). B- Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,26e6). 163
- Figura 39 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 45 V e com uma energia de colisão 25 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 7,67e5). B- Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,06e6). 163
- Figura 40 - Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **35 V** e com uma energia de colisão 25 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 9,70e5). B- Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,25e6). 164
- Figura 41 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 50 V e com uma energia de colisão 25 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 4,14e5). B- Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 6,92e5). 164
- Figura 42 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 30 V e com uma energia de colisão 25 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 8,72e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,15e6). 165
- Figura 43 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 38 V e com uma energia de colisão 25 eV. A – Cromatograma obtido em modo TIC (sinal analítico corresponde à soma dos sinais detetados para os fragmentos 244 e 286 m/z da TX5. B – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,05e6). C – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,23e6). 166

- Figura 44 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 38 V e com uma energia de colisão 27 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,07e6). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 7,96e5)..... 167
- Figura 45 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **38 V** e com uma energia de colisão 23 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 7,65e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,59e6). 167
- Figura 46 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 38 V e com uma energia de colisão 30 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,15e6). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 3,89e5)..... 168
- Figura 47 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 38 V e com uma energia de colisão 20 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 4,46e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 2,02e6). 168
- Figura 48 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 38 V e com uma energia de colisão 35 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 7,60e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 8,15e4)..... 169
- Figura 49 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 38 V e com uma energia de colisão 15 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,48e5). B- Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,44e6)..... 169
- Figura 50 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 40 V e com uma energia de colisão 27 eV. A – Cromatograma obtido em modo TIC (sinal analítico corresponde à soma dos sinais detetados para os fragmentos 244 e 286 m/z da TX4. B – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 6,53e5). C- Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 5,86e5). 171

Figura 51 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 42 V e com uma energia de colisão 27 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 6,26e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 5,39e5).	172
Figura 52 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 38 V e com uma energia de colisão 27 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 6,28e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 5,51e5).	172
Figura 53 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 45 V e com uma energia de colisão 27 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 5,60e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 4,62e5).	173
Figura 54 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 35 V e com uma energia de colisão 27 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 5,09e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 5,12e5).	173
Figura 55 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 30 V e com uma energia de colisão 27 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 5.06e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 4.89e5).	174
Figura 56 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 50 V e com uma energia de colisão 27 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 4.60e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 5.51e5).	174
Figura 57 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 40 V e com uma energia de colisão 27 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 9,96e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 8,10e5).	175

Figura 58 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 40 V e com uma energia de colisão 25 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 8,06e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,03e6).	176
Figura 59 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 40 V e com uma energia de colisão 22 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 4,82e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,46e6).	177
Figura 60 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 40 V e com uma energia de colisão 17 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,63e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 9,29e5).	177
Figura 61 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 40 V e com uma energia de colisão 29 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 9,04e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 5,03e5).	178
Figura 62 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 40 V e com uma energia de colisão 32 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 8,83e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 2,21e5).	178
Figura 63 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 μ M no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 40 V e com uma energia de colisão 37 eV. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 5,75e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 2,05e5).	179
Figura 64 – Percentagem de recuperação da TX5 (0,5 μ M) após extração com AE ou EE. Resultados obtidos após injeção no sistema de LC-MS/MS (10 μ L, em duplicado) e análise da área dos picos dos dois fragmentos maioritários (iões 244 e 286 m/z) detetados nos padrões de TX5 extraídos, comparativamente com os padrões de TX5 não extraídos.	182

Figura 65 – Percentagem de recuperação da TX5 (0,5 μ M) obtida com a extração do analito com AE ou EE após adição de 200 μ L de HBSS pH 12,5. Resultados obtidos após injeção no sistema de LC-MS/MS (10 μ L, em duplicado) e análise da área dos picos dos dois fragmentos maioritários (iões 244 e 286 m/z) detetados nos padrões de TX5 extraídos, comparativamente com os padrões de TX5 não extraídos. Os resultados estão expressos como media \pm SD (em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de Two-way ANOVA, seguido pelo *Sidak's multiple comparisons test*. SD – Desvio padrão. 183

Figura 66 – Percentagem de recuperação da TX5 (0,5 μ M) obtida após a extração com AE e aquecimento da amostra a 40°C durante 10 minutos. Resultados obtidos após injeção no sistema de LC-MS/MS (10 μ L, em duplicado) e análise da área dos picos dos dois fragmentos maioritários (iões 244 e 286 m/z) detetados nos padrões de TX5 extraídos, comparativamente com os padrões de TX5 não extraídos. Os resultados estão expressos como media \pm SD (em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de Two-way ANOVA, seguido pelo *Sidak's multiple comparisons test*. SD – Desvio padrão. 184

Figura 67 – Percentagem de recuperação da TX5 (1 μ M) e da TX4 (1 μ M) obtida com a extração com AE após a adição de HBSS pH 13,5. Resultados obtidos após injeção no sistema de LC-MS/MS (10 μ L, em duplicado) e análise da área dos picos dos dois fragmentos maioritários (iões 244 e 286 m/z) de cada derivado tioxantónico presentes nos padrões de TX5 + TX4 extraídos, comparativamente com os padrões de TX5 + TX4 não extraídos. Os resultados estão expressos como media \pm SD (em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de Two-way ANOVA, seguido pelo *Sidak's multiple comparisons test*. SD – Desvio padrão..... 186

Figura 68 - Percentagem de recuperação da TX5 obtida com a extração com AE após a adição de HBSS pH 13,5 ou pH 12,5. Resultados obtidos após injeção no sistema de LC-MS/MS (10 μ L, em duplicado) e análise da área dos picos dos dois fragmentos maioritários (iões 244 e 286 m/z) detetados nos padrões de TX5 extraídos, comparativamente com os padrões de TX5 não extraídos. Os resultados estão expressos como media \pm SD (em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de Two-way ANOVA, seguido pelo *Sidak's multiple comparisons test* (***p < 0,0001 vs. Adição de HBSS pH 12,5).. SD – Desvio padrão..... 187

Figura 69 - Percentagem de recuperação da TX5 e TX4 em diferentes concentrações, obtida com a extração com AE após a adição de HBSS pH 13,5. Resultados obtidos após injeção no sistema de LC-MS/MS (10 μ L, em duplicado) e análise da área dos picos dos dois fragmentos maioritários (iões 244 e 286 m/z) de cada derivado tioxantónico

presentes nos padrões de TX5 + TX4 extraídos, comparativamente com os padrões de TX5 + TX4 não extraídos. Os resultados estão expressos como media \pm SD (em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de Two-way ANOVA, seguido pelo <i>Sidak's multiple comparisons test</i> . SD – Desvio padrão.....	188
Figura 70 – Representação gráfica da reta de calibração que relaciona a área do pico de cada fragmento maioritário da TX5 (244 e 286 m/z) com a concentração de TX5 (μ M). Os resultados estão expressos como media \pm SD (em triplicado).....	190
Figura 71 - Representação gráfica da reta de calibração que relaciona a área do pico de cada fragmento maioritário da TX4 (244 e 286 m/z) com a concentração de TX4 (μ M). Os resultados estão expressos como media \pm SD (em triplicado).....	190
Figura 72 – Representação gráfica da reta de calibração que relaciona a concentração de TX5 (μ M) com a razão do sinal analítico (área do pico) de cada fragmento da TX5 e do PI. Foi testada uma gama de concentrações de TX5 de 0.005 a 20 μ M e fixada a concentração de PI (1 μ M). Os resultados estão expressos como media \pm SD (em duplicado).	192
Figura 73 – Representação gráfica da reta de calibração que relaciona a concentração de TX5 (μ M) com a razão do sinal analítico (área do pico) de cada fragmento da TX5 e do PI. Foi testada uma gama de concentrações de TX5 de 0.005 – 20 μ M e fixada a concentração de PI (0.1 μ M). Os resultados estão expressos como media \pm SD (em duplicado). A linearidade foi apenas observada para a gama de concentrações de 0,005 a 10 μ M.....	193
Figura 75 – Cromatograma ilustrativo da análise e quantificação da TX5 em amostras de HBSS recolhidas nos estudos de avaliação da permeabilidade da TX5 usando monocamadas de células Caco-2.	195
Figura 76 – Níveis de TX5 detetados nos estudos de permeabilidade com monocamadas de células Caco-2 e Rbe4, ao nível da porção basolateral dos <i>inserts</i> . Os resultados estão expressos como média \pm SD de 4 experiências independentes (em triplicado). No caso das células Caco-2, foi efetuada a deteção e quantificação da TX5 em 4 dos 12 <i>inserts</i> utilizados, enquanto que nos estudos de permeabilidade com células RBE4 foi possível detectar e quantificar a TX5 em 8 dos 12 <i>inserts</i> utilizados. A comparação estatística foi efetuada com o <i>Unpaired t test</i> (**p < 0,001 vs. células Caco-2).....	196
Figura 77 – Cromatograma ilustrativo da análise e quantificação da TX5 em amostras de HBSS recolhidas nos estudos de avaliação da permeabilidade da TX5 usando monocamadas de células RBE4.....	197

Figura 78 – Níveis intracelulares de TX5 (nmol/mg proteína) em células Caco-2 e células RBE4, 8h após exposição a TX5 20 μ M. As células foram semeadas em <i>inserts</i> e expostas ao TX5 na parte apical da monocamada. Os resultados estão expressos como média \pm SD de 4 experiências independentes (em triplicado). A comparação estatística foi efetuada com o <i>Unpaired t test</i> (****p < 0,0001 vs. células Caco-2).....	198
Figura 79 – Níveis intracelulares de TX5 em células Caco-2 e células RBE4, 8h após exposição a TX5 20 μ M, expressos em percentagem dos níveis detetados a nível apical. As células foram semeadas em <i>inserts</i> e expostas ao TX5 na parte apical do poço. Os resultados estão expressos como média \pm SD de 4 experiências independentes (em triplicado). A comparação estatística foi efetuada com o <i>Unpaired t test</i> (****p < 0,0001 vs. células Caco-2).....	199

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 -- Família de transportadores MRP. Adaptado de (Anne T. Nies 2007).	37
Tabela 2 - Substratos P-gp. Adaptado de (Sharom 2007)	45
Tabela 3 - Inibidores P-gp. Adaptado de (Varma, Ashokraj et al. 2003, Sharom 2007). ...	48
Tabela 4 – Transportadores ABC e SLC presentes no intestino delgado. Adaptado de (Russel 2010).....	64
Tabela 5 – Substratos P-gp e CYP3A4. Adaptado de (Kivisto, Niemi et al. 2004).	73
Tabela 6 – Substratos dos Transportadores ABC. Adaptado de (Löscher and Potschka 2005).....	83
Tabela 7 – Linhas celulares imortalizadas de células endoteliais de capilares cerebrais de ratinhos. Adaptado de (Roux and Couraud 2005).	94
Tabela 8 – Condições previamente definidas para o espectrómetro de massa.	124
Tabela 9 – Voltagem de cone e energia de colisão otimizadas para a detecção dos iões produtos majoritários (244 e 286 m/z) da TX5 e TX4.	180
Tabela 10 – Percentagem de recuperação da TX5 (0,5 µM) após extração com AE ou EE.	182
Tabela 11 - Percentagem de recuperação da TX5 (0,5 µM) obtida com a extração do analito com AE ou EE após adição de 200 µL de HBSS pH 12,5.	184
Tabela 12 - Percentagem de recuperação da TX5 (0,5 µM) obtida após a extração com AE e aquecimento da amostra a 40°C durante 10 minutos.	185
Tabela 13 - Percentagem de recuperação da TX5 (1µM) e da TX4 (1µM) obtida com a extração com AE após a adição de HBSS pH 13,5.	186
Tabela 14 - Concentração de padrões de TX4 e TX5 testados na validação do processo extrativo. Para cada concentração de padrão de TX4 + TX5 foram efetuadas 3 extrações independentes.....	188
Tabela 15 - Percentagem de recuperação da TX5 e TX4 em diferentes concentrações, obtida com a extração com AE após a adição de HBSS pH 13,5.	189

ENQUADRAMENTO DO TRABALHO

A resistência a multi-fármacos (MDR) é uma complicação que se caracteriza pelo facto de determinados compostos que entram nas células sejam imediatamente expulsos para o exterior sem que tenham o efeito terapêutico desejado e que afecta grande parte dos tratamentos quimioterapêuticos e do tratamento de patologias a nível da BHE, do intestino e do fígado entre outros órgãos. Um dos responsáveis por esta MDR é a P-gp, transportador mais conhecido e estudado dos transportadores pertencentes aos transportadores da família adenosina trifosfato *binding cassette* (ABC).

A P-gp sendo uma bomba de efluxo, tem como principal função a extrusão de xenobióticos, compostos farmacêuticos e outros substratos para o exterior das células, protegendo assim o organismo contra agentes externos. Inicialmente pensava-se que este transportador encontrava-se presente apenas nas células cancerígenas de onde foi inicialmente isolado, mas verificou-se que este transportador encontra-se presente na maioria dos órgãos e tem uma grande variedade de substratos, como inibidores da protease do VIH, bloqueadores dos canais de cálcio, antibióticos, imunossuppressores entre outros. Pelo facto de ter grande amplitude de substratos, pode ser benéfico evitando situações de toxicidade, mas, ao mesmo tempo, pode prejudicar o tratamento de determinadas patologias pois pode provocar o efluxo dos compostos terapêuticos do seu local de ação, afetando assim a sua biodisponibilidade e impedindo o tratamento.

Assim sendo, o estudo do mecanismo para indução e aumento da atividade da P-gp é de extrema importância, podendo desta forma diminuir ou até evitar situações de toxicidade.

No presente trabalho foi estudado um conhecido indutor da P-gp, derivado tioxantónico (TX5), avaliando-se a sua capacidade de atravessar uma monocamada representativa de modelos celulares de células intestinais (Caco-2) e de células pertencentes à BHE (RBE4). Para o trabalho foi utilizado um método de análise e quantificação do composto por HPLC com o objetivo de quantificar a TX5 nas respectivas matrizes celulares.

Este trabalho encontra-se dividido em seis partes:

1. **Introdução**, parte do trabalho onde é feita uma revisão da bibliografia na qual se aborda assuntos como a anatomia e fisiologia do intestino e da BHE e também a presença de transportadores ABC nestes locais. Mais pormenorizadamente é depois descrita a P-gp e a sua localização nos locais referidos anteriormente, assim como, a sua indução e inibição. Para além disto são também abordadas as xantonas e tioxantonas, mais pormenorizadamente a TX5.
2. **Objetivos** do trabalho desenvolvido a nível laboratorial;
3. **Materiais e métodos** utilizados ao longo dos procedimentos experimentais.
4. **Resultados e discussão** das atividades laboratoriais.
5. **Conclusões** de todo o trabalho realizado e possíveis sugestões.
6. **Referências bibliográficas** que permitiram a realização da tese.

ABREVIATURAS

ABC – Adenosina Trifosfato Binding Cassette
 ADME – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
 ATP – Adenosina Trifosfato
 BCRP – *Breast cancer resistance protein*
 BCSF – Barreira Sangue - Fluido Cerebroespinal
 BD – Biodisponibilidade
 BHE – Barreira Hematoencefálica
 CSF – Fluido Cerebroespinal
 CYP450 – Citocromo P450
 CYP3A4 – Citocromo P450 Família 3 Subfamília A polipéptido 4
 DEX – Dexametasona
 DMSO – Dimetilssulfóxido
 DOX – Doxorrubicina
 HBSS – *Hanks' Balanced Salt Solution*
 HCV – Hydrophobic Vacuum Cleaner
 ICAM-1 – Molécula Intracelular de Adesão 1
 LC-MS – *Liquid Chromatography Mass Spectrometer*
 MDR – Resistência a Multi-Fármacos
 MRP – Proteína Associada à Resistência de Multi-fármaco
 MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
 mRNA – RNA mensageiro
 NBD – Domínio de Ligação ao Nucleótido
 NR – Vermelho Neutro
 OAT – *Organic Anion Transporter*
 OATP – *Organic Anion-Transporting Polypeptide*
 OCT – *Organic Cation Transporter*
 P-gp – Glicoproteína-P
 PQ – Paraquato
 PXR – Receptor X-Pregnane
 RBE4 – *Rat Brain Endothelial Cell Line 4*
 RHO 123 – Rodamina 123
 RPM – Rotações por Minuto
 SLC – *Solute Carrier Family*
 SNC – Sistema Nervoso Central
 SNP – Polimorfismos de Nucleótidos Simples

TEA – Trietilamina

TEER – *Transendothelial Electrical Resistance*

TMD – Domínio transmembranar

TNF α – Fator de Necrose Tumoral alfa

TXs – Tioxantonas

UPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Performance

VER – Verapamilo

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

Xs – Xantonas

Parte I

Introdução

1. Transportadores Membranares

A biodisponibilidade (BD) de uma grande variedade de compostos entre eles fármacos, substâncias naturais e xenobióticos é determinada pelo balanço entre os transportadores de influxo e de efluxo que facilitam o movimento entre as membranas (Silva, Vilas-Boas et al. 2015). Estes transportadores são importantes para manter a homeostase celular e ao mesmo tempo para destoxificar substâncias potencialmente tóxicas (Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

Os transportadores são proteínas membranares que têm como função facilitar a passagem de moléculas para o interior ou exterior das células, prevenindo a acumulação de xenobióticos no interior destas (Morris 2007). Estas proteínas transportadoras asseguram o transporte de nutrientes e de substratos endógenos como iões, aminoácidos, açúcares ou vitaminas protegendo o organismo de toxinas ambientais ou de toxinas provenientes da alimentação. Para além disso, estes transportadores, pelo facto de não possuírem uma elevada especificidade podem realizar o transporte de alguns xenobióticos que possuam uma estrutura similar aos substratos endógenos (Morris 2007).

A passagem destes compostos através da membrana celular depende das características dos compostos como o seu peso, capacidade de distribuição, hidrofobicidade e interação com os transportadores de membrana (Williams, Bauman et al. 2005).

Pelo facto de assegurarem o efluxo e influxo de uma vasta gama de compostos, estas proteínas têm um papel muito importante na BD e, por consequência, na eficácia terapêutica de fármacos e seus metabolitos, assim como na farmacocinética de muitos xenobióticos (Jones and George 2004, Morris 2007).

A maior parte dos transportadores apresentam características transversais:

- São expressos nos tecidos com função de barreira. As células existentes na fronteira destes tecidos são, normalmente, polarizadas para que o transporte de substâncias se realize de uma forma unidirecional;
- Normalmente a expressão de um transportador é restrita a um dos lados da membrana (apical ou basolateral);
- Asseguram o transporte dos substratos por dois mecanismos:
 - ✓ Transporte facilitado – as moléculas atravessam a membrana a favor do gradiente de concentração;
 - ✓ Transporte ativo – as moléculas atravessam a membrana contra o gradiente de concentração ocorrendo o consumo de ATP (Morris 2007);

- Podem ser divididos em transportadores de efluxo e de influxo nos quais, os de efluxo, bombeiam o substrato para fora das células enquanto os de influxo realizam o transporte de substratos para o interior das células (Morris 2007);
- A maioria dos transportadores podem ser molecularmente e mecanisticamente classificados como membros da família de transportadores ABC (ATP Binding Cassette) ou da família de transportadores SLC (Solute Carrier Proteins) (Morris 2007);

Os transportadores ABC e SLC têm grande distribuição no corpo e estão envolvidos no transporte de muitos substratos. Na realidade, muitos deles, podem contribuir para a permeabilidade de fármacos nas células e no processo em que os fármacos têm acesso aos seus alvos farmacológicos e toxicológicos (Russel 2010).

Os transportadores ABC são, por definição, uma família de transportadores membranares de efluxo, pois usam a energia proveniente da hidrólise de ATP para mediar a exportação de fármacos da zona intracelular para a zona extracelular, sempre contra o gradiente de concentração (Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

A superfamília SLC é uma grande família de transportadores com cerca de 20-25% de homologia sequencial, realizando-se a translocação membranares de substratos através de vários mecanismos, incluindo a difusão facilitada, o acoplamento iónico e a troca iónica que, em alguns casos, é conduzida por um gradiente iónico mantido pelos transportadores ativos da superfamília ABC (Morris 2007). Os SLC transportam diversos compostos endógenos iónicos, não iónicos e xenobióticos exercendo-se o transporte a favor ou contra a diferença de potencial eletroquímico. Estes transportadores encontram-se na membrana celular facilitando a absorção celular ou o influxo de substratos (Russel 2010). Alguns transportadores SLC exibem propriedades de efluxo ou são bidirecionais, dependendo do gradiente de concentração dos substratos e dos iões ligados à membrana (Williams, Bauman et al. 2005).

2. ABC transporters

Os transportadores mais estudados são os da família adenosina trifosfato binding cassette (ABC), denominação sugerida por Christopher Higgins em 1992. Estes transportadores têm como principal função fisiológica proteger as células através da sua capacidade de transporte de compostos através da membrana, utilizando a energia proveniente da hidrólise de ATP para mediar a exportação de fármacos da zona intracelular para a zona extracelular, sempre contra o gradiente de concentração (Colabufo, Berardi et al. 2009).

A *ATP-Binding Cassette* (ABC) representa uma grande família de transportadores transmembranares, com cerca de 50 membros, localizados na membrana plasmática. Estes transportadores interagem com vários tipos de substratos entre os quais vitaminas, péptidos, esteroides, polissacarídeos, fosfolípidos, iões, ácidos biliares, fármacos e outros xenobióticos realizando a translocação dos substratos do espaço intracelular para o espaço extracelular, ou para compartimentos intracelulares como o retículo endoplasmático ou ainda para os peroxissomas, contra o gradiente de concentração e após a hidrólise de ATP, sendo assim designados de transportadores ativos primários (Couture, Nash et al. 2006, Morris 2007, Silva, Vilas-Boas et al. 2015). Este grupo representa a maior família de transportadores, encontrando-se distribuídos por todos os órgãos do corpo afetando assim a passagem pela membrana plasmática e, consequentemente, a Absorção, Distribuição, Metabolismo e Eliminação (ADME) (Ambudkar, Kim et al. 2006). Estas proteínas de transporte conferem assim uma resistência intrínseca aos tecidos normais exportando substâncias potencialmente tóxicas ou metabolitos para fora dos tecidos e, por fim, do organismo. As proteínas de transporte limitam assim a penetração de compostos para áreas do corpo que necessitam de proteção contra toxinas como o cérebro, testículos, fígado, intestino e placenta, ao mesmo tempo que têm a função de excretar substratos pela biliar, urina e fezes (Couture, Nash et al. 2006, Lucie Couture 2007).

Os transportadores ABC encontram-se divididos em 7 subfamílias (A-G) baseado na homologia da sequência genética e na organização dos seus domínios de ligação de ATP, também chamados domínios de ligação de nucleótidos (NBD), que possuem cerca de 200 aminoácidos altamente conservados geneticamente (Couture, Nash et al. 2006, Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

A nomenclatura dos diferentes transportadores, realizada pela *Human Gene Nomenclature Committee*, classificou-as do seguinte modo (**figura 1**):

1. Prefixo ABC, correspondente à família de transportadores ABC;
2. Subfamília a que corresponde esse transportador (A-G);
3. Membro da subfamília a que pertence (Committee , Dean and Annilo 2005).

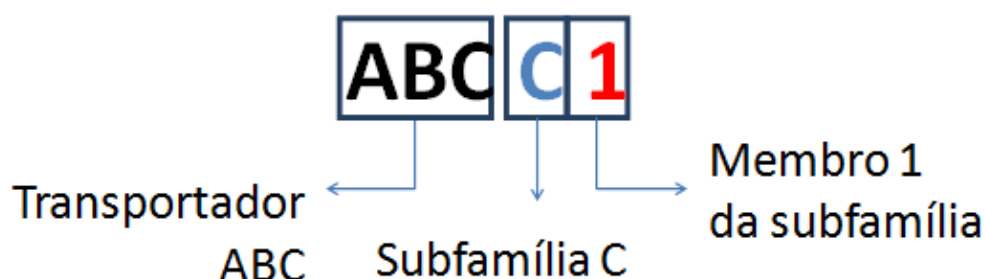


Figura 1 – Nomenclatura dos transportadores ABC. Adaptado de (Committee , Dean and Annilo 2005).

Membros de 3 subfamílias ABC desempenham um importante papel no efluxo de fármacos das células, de onde se destacam a Glicoproteína P (ABCB1/MDR1), a proteína de resistência ao cancro da mama (BCRP, ABCG2) e as proteínas de resistência a múltiplos fármacos (MRPs da subfamília ABCC) (Dean and Annilo 2005, Morris 2007).

2.1 Transportadores MRP

Os membros da família de proteínas de resistência a múltiplos fármacos (MRP/ABCC) são relevantes no transporte tanto de compostos endógenos como de fármacos para tratamento quimioterapêutico e para infeções virais (Leslie, Deeley et al. 2005, Anne T. Nies 2007, DeGorter, Xia et al. 2012).

Estes transportadores foram reconhecidos como sendo bombas de exportação de aniões orgânicos endógenos e aniões orgânicos de xenobióticos particularmente de conjugados de compostos lipofílicos com glutathione estando, alguns, envolvidos na resistência a uma grande variedade de agentes antivirais e quimioterapêuticos (Dean, Rzhetsky et al. 2001, Jones and George 2004, DeGorter, Xia et al. 2012).

Os transportadores desta família podem-se encontrar nos mesmos tecidos variando a extensão da expressão de cada um nos vários tecidos, podendo haver a presença de um tipo de MRP na face basolateral e outro tipo na face apical. Para além disso, a presença de MRP é maior em determinados tecidos do que noutros (Leslie, Deeley et al. 2005, Anne T. Nies 2007, DeGorter, Xia et al. 2012).

A subfamília ABCC (MRP) contém 12 membros (**tabela 1**), ABCC1 até ABCC12, em que ABCC 1-6 (MRP 1-6), ABCC10 (MRP7), ABCC11 (MRP8) e ABCC12 (MRP9)

são transportadores e os outros três são reguladores de condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR/ABCC7) que são constituídos por um canal iônico e dois recetores sulfonilureia, ABCC8 (SUR 1) e ABCC9 (SUR2) (Jones and George 2004).

Tabela 1 -- Família de transportadores MRP. Adaptado de (Anne T. Nies 2007).

Família de Transportadores	Membro da Família	Nome do Gene
Família de proteínas de resistência a múltiplos fármacos (MRP)	MRP1	ABCC1
	MRP2	ABCC2
	MRP3	ABCC3
	MRP4	ABCC4
	MRP5	ABCC5
	MRP6	ABCC6
	MRP7	ABCC10
	MRP8	ABCC11
	MRP9	ABCC12
	CFTR	ABCC7
	SUR1	ABCC8
	SUR2	ABCC9

O CFTR é um canal de iões cloreto que tem um papel fundamental em todas as atividades de secreção daí que mutações neste transportador provoquem fibrose cística (Dean, Rzhetsky et al. 2001).

Estes transportadores localizam-se, preferencialmente, no epitélio renal e intestinal, nos hepatócitos e nas barreiras sangue-tecido tendo, assim, um papel importante na absorção, distribuição e eliminação bem como na proteção de tecidos contra a entrada de toxinas dos xenobióticos (Jones and George 2004, Leslie, Deeley et al. 2005, Anne T. Nies 2007).

Identificaram-se variações de sequência que levam à substituição de aminoácidos nos ABCC/MRPs, e que foram consideradas de interesse clínico, pois podem causar variações interindividuais na resposta ao fármaco (Jones and George 2004, Anne T. Nies 2007). Os transportadores ABCC/MRPs têm entre 1325 aminoácidos para o ABCC4 e 1545 aminoácidos para o ABCC2. Os recetores SUR 1 (ABC8) e SUR 2 (ABCC9) têm 1581 e 1549 aminoácidos respetivamente, sendo assim as proteínas mais longas da subfamília ABCC. Em comparação com a ABCC1, a ABCC3 partilha 58% da identidade de aminoácidos e é o membro mais semelhante com ABCC1. Pelo contrário, o CFTR

partilha apenas 30% da identidade de aminoácidos com o ABCC1 sendo o membro com menos semelhança com o ABCC1 (Jones and George 2004, Anne T. Nies 2007).

2.2 Transportadores ABCG

A subfamília G (ABCG) consiste em 5 membros: ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5 e ABCG8. Os membros ABCG1 e ABCG4 têm grande identidade a nível de aminoácidos (70%) ao contrário dos outros transportadores (no máximo 30%) (Kusuhara and Sugiyama 2007).

Os membros da subfamília G, exceto o ABCG2, têm um papel importante no efluxo de colesterol. Estes transportadores desempenham um papel importante na reversão do transporte de colesterol dos macrófagos para o fígado (ABCG1 e ABCG4) e medeiam a excreção biliar de colesterol (ABCG5 e ABCG8) (Kusuhara and Sugiyama 2007).

Ao contrário de todos os outros transportadores desta subfamília, o ABCG2, realiza o transporte de vários substratos, independentemente da sua estrutura, desempenhando um papel importante na quimioterapia e na distribuição dos fármacos pelos órgãos de expulsão de compostos (fígado e rins) e em barreiras de tecidos (BHE, placenta e coração) (Kusuhara and Sugiyama 2007).

Este transportador, também designado como BCRP, localiza-se no cromossoma 4q22 e tem um papel importante na resistência a múltiplos fármacos sendo primariamente, expresso na membrana apical do intestino delgado, fígado, glândulas mamárias, testículos, BHE e placenta e realiza o efluxo de vários fármacos quimioterapêuticos, incluindo a mitoxantrona, doxorrubicina e metotrexato, assim como determinados carcinogénios da comida e vitaminas, como a riboflavina e o ácido fólico (Dean, Rzhetsky et al. 2001, Coy 2012).

O principal papel do BCRP está relacionado com a prevenção da acumulação de substâncias e aumento da *clearance* de xenobióticos e de produtos endógenos, que pode ser enfatizado pela expressão deste transportador em tecidos como intestino, BHE, placenta e no endotélio de veias e capilares cardíacos (Dean, Rzhetsky et al. 2001, Maliepaard, Scheffer et al. 2001, Meissner, Heydrich et al. 2006). No entanto, o BCRP pode ter um papel negativo nas glândulas mamárias, onde realiza o efluxo de vitaminas, como a riboflavina, ao mesmo tempo que pode provocar um aumento da concentração de alguns fármacos quimioterapêuticos no leite materno, levando à sua acumulação no recém-nascido (Dean, Rzhetsky et al. 2001, Jonker, Merino et al. 2005). Este transportador encontra-se nas células do trofoblasto da placenta, o que sugere que é

responsável tanto pelo transporte de compostos para o sangue fetal como pela remoção de metabolitos tóxicos.

O BCRP é capaz de realizar o transporte de aniões orgânicos conjugados de sulfato e glucoronídeos sendo, no entanto, mais importante a nível da excreção de metabolitos fisiológicos do que de toxinas conjugadas (Dean, Rzhetsky et al. 2001, van Herwaarden and Schinkel 2006).

Estudos recentes demonstram que ocorre expressão de BCRP no coração de ratinhos adultos (Martin, Meeson et al. 2004, Meissner, Heydrich et al. 2006). Esta deteção permitiu evidenciar a presença de uma população de células que expressa BCRP, que é responsável ao mesmo tempo pelo desenvolvimento, manutenção e reparação do coração.

2.3 Glicoproteína-P

A P-gp, detetada pela primeira vez em 1976, está localizada na região cromossômica 7q21.1 sendo também conhecida como MDR1 (Dean, Rzhetsky et al. 2001). Esta proteína de transporte é sintetizada no retículo endoplasmático. Compreende 1276-1280 aminoácidos com uma massa molecular aproximada de 170kDA e resulta da transcrição de dois genes, ABCB1/MDR1 e ABCB4/MDR3 (ou MDR2) devido a uma duplicação de eventos adjacentes no cromossoma 7 (Callen, Baker et al. 1987, Chin, Soffir et al. 1989, Coy 2012).

Este transportador é considerado a principal bomba de efluxo, pois está presente nos mais variados tecidos como células com atividade secretória sendo, simultaneamente, um transportador com capacidade de reconhecer uma grande variedade de compostos tais como compostos aromáticos, lineares, com ou sem carga, básicos ou ácidos (Gottesman, Hrycyna et al. 1995, van Asperen, van Tellingen et al. 1997, Ambudkar, Dey et al. 1999, Sarkadi, Homolya et al. 2006).

A P-gp foi o primeiro transportador clonado e caracterizado através da sua capacidade para conferir resistência a variados fármacos em células cancerígenas que desenvolveram resistência a múltiplos fármacos (MDR) quimioterapêuticos, resultando assim na falha de muitos tratamentos (Dean, Rzhetsky et al. 2001). Considerava-se que o transportador era altamente expresso apenas nas células cancerígenas. No entanto, posteriormente, verificou-se que está presente em membranas de vários órgãos como fígado, ductos biliares, intestino, rins, na BHE, assim como em linfócitos. O transportador limita a absorção intestinal de xenobióticos excretando estes compostos para a urina e biliar e previne a sua acumulação em órgãos críticos como o coração e cérebro, atuando como agente de destoxificação. É também sugerido que a P-gp está envolvida em

processos de transporte com a finalidade de balancear a concentração intracelular de alguns compostos como citocinas, hormonas, aldosterona e cortisol (Chaudhary and Roninson 1991, Eckford and Sharom 2009).

A P-gp apresenta assim um papel de proteção do organismo, funcionando como uma barreira fisiológica, onde participa de forma ativa na farmacocinética de qualquer composto que seja seu substrato, podendo assim provocar alterações na BD do composto (Dean, Rzhetsky et al. 2001, Solbach, König et al. 2006, Coy 2012).

2.3.1 Estrutura da P-gp

De uma forma geral, existem três tipos de estruturas de transportadores ABC que partilham entre si 30-50% (200-250 aminoácidos) da homologia das sequências e são compostos por duas partes sequencialmente similares (Couture, Nash et al. 2006).

A P-gp possui dois domínios: um domínio hidrofóbico com um terminal – NH₂ e um terminal – COOH, designado por domínio de ligação a nucleótidos (*Nucleotide Binding Domains* – NBD) e por um domínio transmembranar (*Transmembranar Binding Domains* – TMD). A P-gp é constituída por dois NBD, NBD1 e NBD2, que são os locais de ligação e hidrólise do ATP citoplasmático, resultando em energia disponível para ser utilizada em transporte transmembranar e por dois TMD, TMD1 e TMD2, no qual cada TMD é constituído por 6 segmentos em alfa hélice ligados por uma sequência polipeptídica (Ambudkar, Dey et al. 1999, Couture, Nash et al. 2006, Sharom 2007, He, Li et al. 2011).

Os transportadores ABC são dependentes do ATP que é necessário para realizar o transporte transmembranar de substratos contra o gradiente de concentração da zona intercelular para a zona extracelular. À distância de 100-200 aminoácidos do domínio NBD, encontram-se duas regiões designadas Motivo Walker A e Motivo Walker B que se encontram separados por 90-120 aminoácidos e que são conservados em todos os transportadores ABC. No Motivo Walker A está presente um resíduo de lisina que está envolvido na ligação do grupo fosfato do ATP; no Motivo Walker B está presente um resíduo de ácido de aspartato que parece interagir com o ião magnésio (Mg²⁺). Para além destas duas regiões existe também uma sequência designada “Signature Sequence” (Motivo C) onde cada proteína tem uma sequência específica que a define e que se supõe estar envolvida no reconhecimento, ligação e hidrólise do ATP (Leslie, Deeley et al. 2005, Sarkadi, Homolya et al. 2006).

and Klaassen 2006, Zhou 2008). Podemos assim concluir que a presença desta glicoproteína no aparelho digestivo impede a passagem e acumulação de xenobióticos no organismo, sendo este o seu principal papel fisiológico no organismo e, ao mesmo tempo, a nível intestinal é responsável pela limitação da entrada/absorção para os enterócitos (Doring and Petzinger 2014).

No fígado, órgão onde ocorrem mais reações metabólicas, a P-gp é encontrada no lado apical das células das membranas caniculares dos hepatócitos e das células da vesícula biliar para encaminhar todos os compostos e tóxicos para a bília ou circulação sistémica (Leslie, Deeley et al. 2005, Choudhuri and Klaassen 2006, Zhou 2008). A presença da P-gp em ambos os locais permite que xenobióticos que sejam substratos para este transportador mas que não tenham sido eliminados, entrem de novo para a circulação portal de modo a serem excretados pela bília (Leslie, Deeley et al. 2005).

A nível renal a P-gp é expressa na superfície apical das células epiteliais dos túbulos proximais controlando o efluxo de vários compostos e xenobióticos do sangue para a urina, principalmente moléculas hidrofóbicas (Schaub, Kartenbeck et al. 1999, Lin and Yamazaki 2003, Masereeuw, Notenboom et al. 2003). A expressão da P-gp a nível dos canalículos dos hepatócitos e das células tubulares renais aumenta a eliminação dos compostos, para a bília ou urina, respetivamente (Lin and Yamazaki 2003).

Como todos estes órgãos têm função de excreção foi sugerido que a P-gp exerce o seu papel fisiológico na eliminação de metabolitos endógenos ou xenobióticos através do transporte mediado de fase III (Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

No sistema imunológico, este transportador é expresso na medula óssea em células sanguíneas como os linfócitos natural killer (NK) e linfócitos T como CD3+, CD56+, CD8+ e a sua expressão nestas células vai aumentando com a idade (Thiebaut, Tsuruo et al. 1987, Chaudhary and Roninson 1991, Kock, Grube et al. 2007, Manceau, Giraud et al. 2012).

Na BHE este transportador previne que determinados compostos atravessem o sistema nervoso central (SNC), sendo a P-gp considerada o fator que mais limita a entrada de substratos no cérebro (Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

A P-gp tem também um papel de proteção a nível do ouvido interno, onde se expressa nas células endoteliais capilares do coclea e da vestibular (Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

Foram também detetados altos níveis de expressão na superfície luminal das células epiteliais secretórias no endométrio de grávidas, assim como na placenta, onde, supostamente, tem um papel fundamental na proteção do feto da toxicidade de uma

variedade de moléculas endógenas ou exógenas, provenientes do sangue materno (Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

Em conclusão a localização da P-gp sugere que a proteína tem um papel fisiológico:

- Fundamental na proteção de órgãos suscetíveis como o cérebro ou ouvido interno, assim como na proteção dos fetos contra xenobióticos;
- Secreção de metabolitos e xenobióticos para a bile, urina e do lúmen do trato gastrointestinal;
- Transporte de hormonas da glândula adrenal e do epitélio uterino (Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

2.3.3 Mecanismo de transporte da P-gp

Até ao momento estão descritos três tipos de mecanismos de transporte para a P-gp:

1. Modelo clássico ou poro;
 2. Modelo de Aspiração Hidrofóbica (*Hydrophobic vacuum cleaner*, HVC) ou “ATP-Switch Model”;
 3. Modelo de Flippase (Borst and Elferink 2002).
- 1 No modelo clássico ou poro há dois TMD organizados numa disposição favorável e com capacidade de formar poros, a partir dos quais a P-gp realiza o efluxo e é assim capaz de expulsar ativamente os fármacos do citoplasma para o espaço extracelular (Borst and Elferink 2002);
 - 2 No modelo de aspiração hidrofóbica a P-gp sofre mudanças conformacionais através da hidrólise de ATP e consegue assim bombear substratos neutros ou carregados (Gottesman, Fojo et al. 2002). Este modelo baseia-se na alteração entre estados de afinidade altos e baixos de ligação de substratos e, ainda, no ciclo de hidrólise do ATP, podendo ser explicado em quatro passos (**figura 3**):
 - Ligação de substrato;
 - Ligação do ATP e translocação do substrato;
 - Hidrólise de ATP;
 - Conformação de substrato de ligação (inicial) e dissociação do ADP e Fosfato inorgânico (Pi) (Higgins and Linton 2004, Sharom 2007, Coy 2012).
 - 3 O outro modelo de transporte é o modelo de flippase no qual o substrato se liga à P-gp e é orientado para a membrana interna, ficando a porção hidrofóbica do substrato orientada para o lado hidrofóbico da proteína de transporte. Acontece assim uma mudança conformacional devido à ligação que ocorre entre a NBD e o ATP. Esta mudança de conformação evita a entrada de compostos, expulsando-os para o meio extracelular (Higgins and Linton 2004, Sharom 2007, Coy 2012).

O modelo de aspiração hidrofóbica é consistente com a estrutura terciária da P-gp, indicando que os substratos têm acesso ao poro a partir da fase lipídica da membrana (Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

2.3.4 Substratos P-gp

Como já foi referido anteriormente, a P-gp é considerado a principal bomba de efluxo, estando presente nos mais variados tecidos. Em simultâneo tem a capacidade de reconhecer uma grande variedade de compostos que variam entre si em tamanho, estrutura e função, variando de moléculas pequenas como catiões orgânicos, carboidratos, aminoácidos até macromoléculas como polissacarídeos e proteínas (Shapiro and Shear 2002, Sharom 2011, Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

Foi demonstrado que um composto pode interagir com a P-gp se contiver:

- 1- Grupos dadores de dois eletrões com uma separação espacial de 2,5 +/- 0,3 Å;
- 2- Grupos dadores de dois eletrões com uma separação espacial de 4,6 +/- 0,6 Å;
- 3- Grupos dadores de três eletrões com uma separação espacial de 4.6+/- 0,6 Å (Seelig 1998).

Foi também comprovado que a separação na membrana lipídica é um passo limitante na interação de um substrato com a P-gp e que a dissociação do complexo formado entre a P-gp e o substrato é determinada pelo número e força das ligações de hidrogénio formadas entre ambas (Seelig 1998, Seelig and Landwojtowicz 2000).

Como principal bomba de efluxo esta glicoproteína tem a capacidade de interagir com centenas de substratos, geralmente não polares, compostos anfipáticos fracos que incluem produtos naturais, fármacos anticancerígenos, esteroides, péptidos cíclicos e lineares, lípidos, citocinas pequenas, como a interleucina-2, interleucina-4 e interferão- γ (**tabela 2**) (Sharom 2007).

A P-gp interage ao mesmo tempo com substratos citotóxicos que são, normalmente, lipofílicos que entram nas células por difusão passiva através da membrana plasmática e ligam-se depois ao alvo celular que podem ser microtúbulos ou ADN, por exemplo (Sharom 2011).

A P-gp tem preferência por moléculas hidrofóbicas, algumas catiónicas e que contenham anéis aromáticos com átomos de azoto de carga positiva (Shapiro and Shear 2002, Sharom 2011).

Ao mesmo tempo, características do substrato são importantes como a lipofilicidade, a capacidade de fazer ligações de hidrogénio, o peso molecular e a área de superfície (Bain, McLachlan et al. 1997, Wang, Kuo et al. 2003). Estes substratos da P-gp podem atuar como inibidores ou indutores através da alteração da sua atividade ou expressão (Wessler, Grip et al. 2013).

Tabela 2 - Substratos P-gp. Adaptado de (Sharom 2007)

Alcaloides Vinca	Esteroides
-------------------------	-------------------

Vinblastina Vincristina	Aldosterona Dexametasona
Antraciclinos Doxorubicina Daunorrubicina	Glicosídeos Cardíacos Digoxina
Taxanos Paclitaxel Docetaxel	Inibidores da protease VIH Indinavir Saquinavir Ritonavir
Agentes Citotóxicos Colchicina Mitoxantrona	Analgésicos Morfina

2.3.5 Inibidores P-gp

Existe uma segunda classe de compostos que interage com a P-gp, os moduladores, também conhecidos como MDR “chemosensitizers” ou inibidores. Estes compostos foram criados com o objetivo de reverter o fenómeno de resistência a múltiplos fármacos (MDR) que ocorre em tratamentos quimioterapêuticos e que é considerado, ao mesmo tempo, o maior entrave nestes tratamentos (Borst and Elferink 2002). Este entrave resulta do facto das células desenvolverem resistência à funcionalidade e estrutura de compostos de modo adquirido (devido à exposição) e resistência intrínseca (devido a fenómenos genéticos e epigenéticos). (Gottesman, Fojo et al. 2002).

Os inibidores foram assim criados de modo a reverter a MDR em células *in vitro*, interferindo com a capacidade da P-gp exercer o efluxo de compostos e, assim, gerar um gradiente de concentração do composto (Sharom 2007).

Os inibidores interagem com o mesmo local de ligação dos substratos e competem pelo transporte, podendo realizar a inibição deste transportador por 4 mecanismos:

1. Bloquear o local de ligação do substrato por mecanismo competitivo não competitivo ou alostéricamente (Varma, Ashokraj et al. 2003, Silva, Vilas-Boas et al. 2015);
2. Interferir com a hidrólise de ATP (Shapiro and Ling 1997, Silva, Vilas-Boas et al. 2015);
3. Inibição da ligação ao ATP no momento da translocação (Amin 2013);

4. Alterar a integridade dos lípidos da membrana celular (Ruetz and Gros 1994, Amin 2013, Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

Vários agentes farmacológicos foram identificados como inibidores da P-gp, possuindo uma grande diversidade estrutural entre os quais se destacam os bloqueadores dos canais de cálcio, antagonistas da calmodulina, inibidores da proteína cinase C, agentes imunossupressores, antibióticos e surfatantes (Hyde, Emsley et al. 1990). Muitos destes moduladores como o Verapamilo (VER), ciclosporina A, são transportados pela própria Glicoproteína e partilham algumas características em comum com os substratos, nomeadamente a estrutura em anel aromático e alta lipofilia (Sharom 2007).

A forma como os moduladores atuam a nível molecular ainda não se encontra muito bem esclarecida.

Existem assim 4 gerações de inibidores de P-gp (**tabela 3**):

1. A primeira geração corresponde a inibidores já utilizados a nível farmacêutico para tratamentos específicos mas, também, com capacidade para bloquear a P-gp, como, VER, ciclosporina A, antiarrítmicos e neurolépticos como a quinidina (Silva, Vilas-Boas et al. 2015). A eficácia clínica destes fármacos é limitada consoante a sua toxicidade sendo necessárias grandes concentrações no organismo para inibir a bomba, o que pode levar à toxicidade (Choudhuri and Klaassen 2006). Para além disso, estes inibidores são também substratos de enzimas e de outros transportadores, levando a interações farmacocinéticas (Lomovskaya and Bostian 2006, Lomovskaya, Zgurskaya et al. 2007).

2. A segunda geração de moduladores como o R-VER, valspodar (PSC-833), biricodar (VX-710) e elacridar (GF120918) são derivados dos moduladores da primeira geração, possuindo baixa atividade farmacológica mas, ao mesmo tempo, grande afinidade com a bomba (Silva, Vilas-Boas et al. 2015). No entanto, apesar destes moduladores serem menos tóxicos que os de primeira geração são capazes de produzir efeitos colaterais extremos. Estes inibidores conseguem também inibir o Citocromo P450 Família 3 Subfamília A Polipéptido 4 (CYP3A4) e outros transportadores da família ABC complicando o metabolismo normal dos compostos (Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

3. Os moduladores de terceira geração como zosuquidar (LY335979), laniquidar (R101933) e tariquidar (XR9576) são inibidores seletivos da P-gp encontrando-se ainda em desenvolvimento (Ponte-Sucre 2007). Têm maior afinidade

que os outros inibidores e menor toxicidade. Foram desenvolvidos através do conhecimento da estrutura da bomba de efluxo para cumprir os requisitos de menor toxicidade e maior afinidade (Malingre, Beijnen et al. 2001, Kuppens, Witteveen et al. 2007, Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

4. Aos inibidores de quarta geração pertencem compostos de origem natural e sintética. O mecanismo de ação consiste na alteração da integridade dos lípidos da membrana por troca da estrutura secundária e terciária. Neste caso a P-gp estará alterada e assim será impedida de conduzir o efluxo dos seus substratos (Werle 2008).

O fenómeno de inibição envolvendo a administração de fármacos pode levar a alterações no metabolismo aumentando os níveis plasmáticos.

Assim sendo, a inibição da P-gp provoca alterações na farmacocinética:

- Aumenta absorção;
- Aumenta o tempo de semi-vida do composto;
- Reduz excreção ou clearance nos túbulos proximais;
- Aumenta a recaptação (Varma, Ashokraj et al. 2003).

Pelo facto de esta bomba encontrar-se em vários órgãos e tecidos, a sua inibição poderá aumentar a absorção, ao mesmo tempo que pode levar a diferentes fases de distribuição, metabolismo e eliminação dos seus substratos (Batrakova, Miller et al. 2001, Varma, Ashokraj et al. 2003).

Tabela 3 - Inibidores P-gp. Adaptado de (Varma, Ashokraj et al. 2003, Sharom 2007).

Geração	Fármacos
Primeira Geração	Verapamilo, Ciclosporina A, Reserpina, Quinidina, Tamoxifeno
Segunda Geração	Valspodar (PSC 833), Dexaverapamilo, Dexaniguldipina, DofequidarFumarate (MS-209)
Terceira Geração	Laniquidar, Elacridar, Tariquidar, Bricodar, Zosuquidar

Quarta Geração	Alginatos, Gomas Aniônicas Poloxâmeros, Tiómeros, PEG, TWEN-20
-----------------------	---

2.3.6 Indutores P-gp

A P-gp tem um papel importantíssimo no reconhecimento e efluxo de compostos, resultando na diminuição da acumulação intracelular de xenobióticos o que por sua vez resulta na prevenção contra a toxicidade (Dinis-Oliveira, Duarte et al. 2006, Silva, Carmo et al. 2011).

De modo a aumentar a atividade e expressão da P-gp esta pode ser induzida por uma grande variedade de compostos, proporcionando uma sobrevivência celular a longo prazo, sendo uma importante estratégia terapêutica (Silva, Sousa et al. 2014).

A indução da P-gp pode ser útil em vários contextos:

- Medida terapêutica em intoxicações;
- Medida profilática de doenças associadas a xenobióticos, aumentando a capacidade de eliminação dos tóxicos;
- Medida co-terapêutica na redução dos efeitos colaterais das terapias anticancerígenas (ex: coração e cérebro) através da indução da P-gp especificamente no órgão-alvo (Zhou 2008).

A indução da P-gp por fármacos é mais relevante em duas áreas: a mediação da interação fármaco-fármaco, levando a alteração da absorção do fármaco e da BD oral, e o desenvolvimento de MDR em células cancerígenas aos agentes quimioterapêuticos (Zhou 2008, Silva, Sousa et al. 2014).

A consequência da indução da P-gp depende de fatores associados ao indutor, ao indivíduo e das substâncias que foram administradas juntamente com o indutor (Zhou 2008).

A P-gp não tem um indutor específico, mas pode ser induzida por uma grande variedade de compostos (Zhou 2008). É o caso da dexametasona (DEX), glicocorticoide sintético, que tem sido utilizado eficazmente no tratamento de intoxicações por paraquato (PQ); descobriu-se que a sua ação está relacionada com um aumento da expressão da P-gp a nível da membrana plasmática, levando a uma maior eliminação de PQ dos pneumócitos e, subsequente, excreção fecal (Dinis-Oliveira, Duarte et al. 2006, Dinis-Oliveira, Remiao et al. 2006, Dinis-Oliveira, Sarmiento et al. 2006).

Outros fármacos que funcionam como indutores são rifampicina, hipericina e hiperforina (antidepressivos *Ervas St. John's*) e agentes quimioterapêuticos como a

doxorubicina (DOX) (Chaudhary and Roninson 1993, Fardel, Lecureur et al. 1997, Tian, Koyabu et al. 2005, Kim, Park et al. 2008).

Os níveis de P-gp estão também aumentados na presença do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) sugerindo que esta citocina pró-inflamatória, além de substrato, também induz a expressão de P-gp nas membranas (Dinis-Oliveira, Remiao et al. 2006, Silva, Carmo et al. 2011, Vilas-Boas, Silva et al. 2011). Não só compostos químicos são descritos como indutores, mas também o stress físico, as radiações UV, raios X e choque térmico induzem a P-gp (Silva, Sousa et al. 2014). Está demonstrado que fatores genéticos e ambientais influenciam a expressão e também a atividade da P-gp. Por exemplo, a expressão ou função da P-gp é francamente alterada por algumas condições patológicas, como o caso do cancro, diabetes e Alzheimer (Tada, Wada et al. 2000, Hartz, Miller et al. 2010).

2.3.7 Interação P-gp

Os substratos da P-gp incluem muitos fármacos que são usados normalmente no tratamento de patologias humanas. Consequentemente a proteína tem um papel fundamental na absorção e disposição de compostos e é um importante fator na farmacocinética de vários fármacos e claro na resposta clínica. Os substratos da P-gp incluem fármacos anticancerígenos, inibidores da protease do VIH, analgésicos, bloqueadores dos canais de cálcio, agentes imunossupressores, glicosídeos cardíacos, antihelmínticos, antibióticos entre outros (Lin and Yamazaki 2003, Sharom 2007).

A resistência aos fármacos é considerada a maior causa de insucesso na terapia anticancerígena. Apesar de todos os progressos nesta área, apenas aproximadamente 50% dos cancros são suscetíveis à quimioterapia, e destes mais de 50% desenvolve rapidamente resistência aos fármacos. A resistência a múltiplos fármacos (MDR) pode ser definida como sendo um fenómeno no qual a sobreexpressão da P-gp em células tumorais causa o efluxo dos mais variados agentes quimioterapêuticos, resultando no insucesso do tratamento. Esta MDR é caracterizada pelo seguinte:

- Resistência cruzada entre uma série de fármacos não relacionados entre si;
- Decréscimo da acumulação de compostos em células cancerígenas;
- Aumento da expressão da P-gp;
- Reversão do fenótipo por uma variedade de compostos diferentes;

Uma das principais razões para o insucesso dos tratamentos quimioterapêuticos reside na capacidade das células tumorais conseguirem tornar-se resistentes a vários fármacos anticancerígenos (Higgins 2007, Zhou 2008).

Vários mecanismos foram relatados como tendo um papel importante no fenómeno da MDR como: indução do sistema de efluxo (P-gp), alteração da expressão ou função das proteínas alvo (topoisomerase e tubulina, indução da via destoxificação (glutathione-S-transferase que catalisa a conjugação da glutathione e fármacos) e alterações na via de sinal apoptótico (Higgins 2007, Pauwels, Erba et al. 2007).

A descoberta em 1976 da principal proteína membrana de efluxo, a P-gp, originou muita investigação clínica. O facto de ser altamente expressa nas células cancerígenas, mas também por estar presente fisiologicamente no intestino, nas células endoteliais da barreira hematoencefálica e envolvida no metabolismo do fígado e na excreção renal, afeta diretamente a BD e o efeito biológico dos compostos (Lin 2003, Zhang, Bachmeier et al. 2003).

Alguns tumores expressam a P-gp antes do tratamento quimioterapêutico (cancro colorretal e renal) enquanto noutros a expressão deste transportador aumenta após a exposição a fármacos MDR (leucemias, linfomas, mielomas, cancro da mama e ovários). De um modo geral, pacientes com tumores onde se encontra presente a P-gp têm uma resposta menos eficaz à quimioterapia. Há provas que ligam a expressão da P-gp com a baixa resposta à quimioterapia em leucemias mieloides agudas (Baguley 2002, Sharom 2007).

Como a P-gp interage com um grande número de fármacos, a eficácia clínica de um tratamento muitas vezes está dependente do comportamento da P-gp, que pode alterar a absorção e distribuição dos fármacos nos mais variados tecidos (Zhou 2008).

2.3.7.1 Interação Intestinal

A interação de fármacos com a P-gp pode causar um baixo *uptake* no intestino, reduzindo assim a BD oral e prevenindo a distribuição do composto aos órgãos alvo, como cérebro, o que se torna um problema grave no tratamento de patologias cerebrais (Sharom 2007).

Ultrapassar a presença da P-gp no epitélio intestinal pode ser um problema sério na descoberta de novos fármacos dado que novos candidatos podem ser mal absorvidos tornando-os clinicamente ineficazes. Adicionalmente é importante realizar o screening dos substratos da P-gp quando se desenvolve fármacos cujo alvo é o cérebro, dado que, na maioria dos casos, a sua eficácia depende da capacidade em atravessar a BHE (Sharom 2007).

A nível intestinal a P-gp regula a absorção e eliminação de compostos como o paclitaxel, a digoxina, a docetaxel, entre outros compostos, determinando assim o seu impacto clínico no organismo.

Num estudo realizado por Greiner et. al (1999), foi demonstrado que a digoxina, sendo um substrato da P-gp renal e intestinal, principalmente das células duodenais, quando administrada em simultâneo com a rifampina resulta em níveis inferiores da digoxina a nível plasmático em resultado da indução que a rifampina provoca na P-gp duodenal (de Lannoy and Silverman 1992, Ito, Koren et al. 1993, Schinkel, Wagenaar et al. 1995). A rifampina foi anteriormente identificada em células do carcinoma humano do cólon como um substrato indutor da P-gp (Greiner, Eichelbaum et al. 1999). Neste estudo, a cada voluntário foi realizada uma endoscopia antes e nove dias após a administração de rifampina, de forma a realizar uma biópsia duodenal para verificar a indução da P-gp nos enterócitos (**figura 3**).

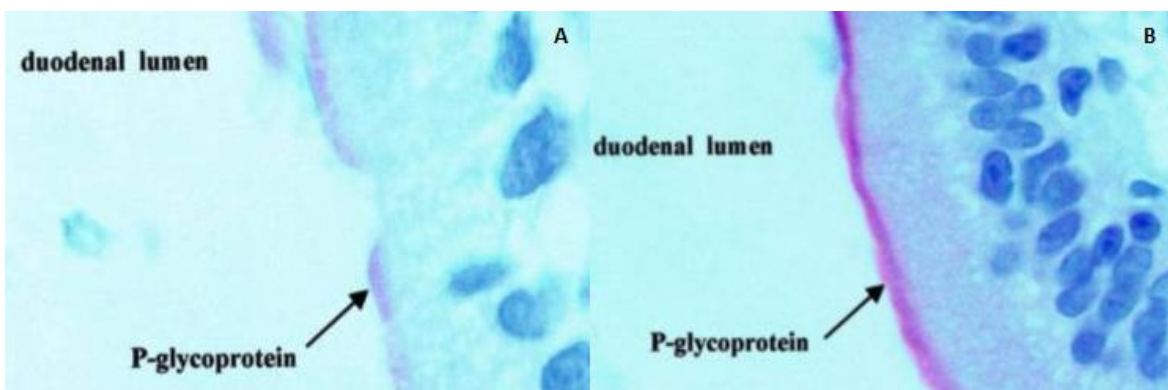


Figura 3 - Biópsia duodenal antes (A) e 9 dias após (B) a administração de rifampina. Adaptado de (Greiner, Eichelbaum et al. 1999).

Esta colheita de amostra intestinal é realizada de modo a provar-se que a P-gp intestinal tem grande influência na concentração plasmática da digoxina e que a rifampina provoca uma diminuição da concentração plasmática deste fármaco por indução dessa mesma glicoproteína (Greiner, Eichelbaum et al. 1999).

Noutro estudo, van Zuylen et al. (2000) conseguiu determinar a influência da P-gp na disposição metabólica do agente antineoplásico, docetaxel (taxotere) em humanos. Neste estudo, foi administrado aos voluntários docetaxel juntamente com um inibidor da P-gp, o R101933 (van Zuylen, Verweij et al. 2000).

O agente antineoplásico docetaxel é metabolizado pela CYP3A4 no fígado e nos enterócitos, formando quatro metabolitos que têm uma menor atividade citotóxica no tumor e nas células hematopoiéticas não malignas quando comparado com o docetaxel. O metabolito mais importante designado como M4 é excretado de forma eficiente através

da via biliar para o lúmen intestinal, imediatamente após a sua formação sendo a sua taxa de reabsorção baixa (van Zuylen, Verweij et al. 2000). Neste estudo foi possível verificar que a coadministração do docetaxel e do inibidor R101933 provoca um aumento da concentração de metabolitos do agente antineoplásico nas fezes, indicando uma eficiente destoxificação do docetaxel antes de alcançar a circulação sanguínea. Quando o docetaxel é administrado de forma isolada, a sua concentração nas fezes é muito superior, enquanto os níveis de metabolitos é inferior, o que indica uma taxa reduzida de metabolização (van Zuylen, Verweij et al. 2000). Conclui-se então que a P-gp intestinal tem um papel fundamental na eliminação fecal do docetaxel através da modulação da sua reabsorção após a secreção hepatobiliar. (van Zuylen, Verweij et al. 2000)

Um estudo realizado por Dresser et al. (2003) permitiu verificar que a P-gp pode ser induzida por múltiplos fármacos após exposição repetida e continuada a fármacos como a rifampicina e o hipericão (Dresser, Schwarz et al. 2003).

A nível intestinal a resistência adquirida ou intrínseca de células malignas a taxanos e outros compostos anticancerígenos naturais está ligado ao mecanismo da MDR. Um estudo realizado por van Zuylen et al. (2000) avaliou a função da P-gp a nível da disposição plasmática e via da eliminação fecal do docetaxel, um dos mais conhecidos substratos da P-gp combinando o tratamento com um inibidor o R101933 (van Zuylen, Verweij et al. 2000). Este estudo demonstrou que a P-gp intestinal desempenha um papel principal na eliminação fecal do docetaxel sem modificar o comportamento farmacocinético do composto na circulação sistémica. A coadministração do composto com o inibidor R101933 tem um efeito na eliminação fecal do docetaxel alterando a excreção do composto, passando este a ser excretado quase totalmente através do seu metabolito principal (M4) em vez de ser excretado como composto original (van Zuylen, Verweij et al. 2000).

A nível intestinal foi realizado um estudo por Mealey et al (2004) que permitiu avaliar os efeitos a nível intestinal da administração simultânea de um inibidor da P-gp com um substrato da P-gp. Neste caso foi administrado um inibidor antes da administração de morfina o que permitiu verificar que a concentração de morfina a nível plasmático aumentou duas vezes mais do que em relação à administração isolada de morfina. Isto prova que atividade da P-gp a nível das células intestinais pode levar a um aumento dramático da BD do composto, que o aumento da atividade da P-gp devido a uma variedade de fatores como interações entre drogas ou mutações genéticas do gene MDR1 podem, possivelmente, levar a uma falha terapêutica para uma grande variedade de compostos que são substratos da P-gp (Zhou 2008).

2.3.7.2 Interação na BHE

A BHE contribui para a homeostase cerebral protegendo o cérebro contra compostos endógenos e exógenos, potencialmente perigosos. O efluxo ativo dos transportadores da família ABC na BHE são, cada vez mais, reconhecidos como essenciais para a distribuição de fármacos para o SNC e para a sua eliminação deste mesmo SNC (Löscher and Potschka 2005).

No entanto, transportadores da família ABC, mais particularmente a P-gp, podem também limitar a distribuição de fármacos benéficos para o tratamento de patologias a nível do SNC.

Um estudo realizado por Yu XY et al. (2007) avaliou o papel da P-gp na penetração da Glabridina através da BHE usando vários modelos *in vitro* e *in vivo*. A glabridina é o composto principal constituinte da glabra *Glycyrrhiza* que é utilizada normalmente no tratamento de patologias a nível cardiovascular e do SNC e que é um substrato da P-gp (Yu, Lin et al. 2007).

Através deste estudo foi possível verificar que a P-gp limita a penetração deste composto no cérebro através da BHE e pode causar resistência à terapia por glabridina em patologias a nível do SNC e possíveis interações entre fármacos (Yu, Lin et al. 2007).

Outro estudo realizado por Narang et al (2008) no qual foi avaliado se o tratamento por DEX aumenta a expressão e atividade dos transportadores MDR a nível da BHE. Este composto é normalmente utilizado como agente antineoplásico para aliviar as dores associadas com a quimioterapia e para reduzir a pressão intracraniana. Neste estudo foram utilizadas células endoteliais dos microvasos cerebrais do ratinho e foram avaliados vários transportadores como o BCRP, P-gp e Mrp2. Verificou-se que o tratamento para tumores cerebrais através da DEX pode aumentar a expressão dos transportadores MDR na BHE através de vias que envolvem os recetores glucocorticoides e o PXR (Narang, Fraga et al. 2008).

2.3.7.3 Interação Renal

O rim tem um papel essencial na eliminação de numerosos xenobióticos hidrofílicos, incluindo, fármacos, toxinas e compostos endógenos. A nível renal a P-gp realiza a extrusão de compostos com diversas estruturas, como, alcaloides vinca, antraciclínicos, esteroides, ciclosporinas, tacrolimus, entre outros. A P-gp encontra-se expressa na membrana dos túbulos proximais, onde bombeia vários xenobióticos hidrofóbicos para o lúmen e o facto de realizar o efluxo do mais variado tipo de compostos permite explicar a sua importância clínica na interação com fármacos (Inui, Masuda et al. 2000).

Um estudo realizado por Hori et al. (1993) permitiu avaliar o mecanismo de secreção da digoxina, substrato da P-gp, pelos túbulos renais assim como a sua interação com a quinidina ou o VER em rins de ratinhos. Através deste estudo foi possível verificar que a digoxina é secretada pela P-gp localizada na membrana luminal das células tubulares epiteliais e que a inibição da P-gp causa importantes interações clínicas com a quinidina e o VER (Hori, Okamura et al. 1993).

A cisplatina é um composto anticancerígeno, famoso por ser utilizado no tratamento de vários tumores sólidos. No entanto, é sabido que uma das desvantagens deste composto é o facto de causar uma nefrotoxicidade severa o que provoca assim uma diminuição da dosagem e, ao mesmo tempo, de uma necessidade de maior hidratação dos pacientes (Takara, Tsujimoto et al. 2003). A vulnerabilidade dos rins a este fármaco está em princípio relacionada com a sua função de excreção desse mesmo composto, pois a concentração deste composto nas células epiteliais do túbulo proximal ultrapassam em 5 vezes a concentração a nível plasmático, resultando assim em nefrotoxicidade (Takara, Tsujimoto et al. 2003). A cisplatina não é um substrato da P-gp, mas não é claro se este composto provoca ativação da P-gp para realizar o efluxo deste composto e se afeta a função/expressão da P-gp nas células tubulares renais. Assim sendo, um estudo realizado por Takara et al. (2003) permitiu avaliar os efeitos da cisplatina na função e expressão da P-gp numa linha celular de células epiteliais renais de porco (LLC-PK1) que têm uma estrutura e função similar à das células epiteliais do túbulo proximal renal e expressam baixos níveis de P-gp. A partir deste estudo foi possível verificar que a exposição à cisplatina pode causar um aumento da função e expressão da P-gp na linha celular LLC-PK1 (Takara, Tsujimoto et al. 2003).

2.3.7.4 Interação nas Células Cancerígenas

A resistência de um tumor a vários agentes quimioterapêuticos foi reconhecida como a principal razão para o insucesso na terapia. A MDR é definida como a resistência cruzada ou insensibilidade das células cancerígenas às ações citoestáticas ou citotóxicas de vários fármacos anticancerígenos que são estruturalmente ou funcionalmente não relacionados e têm diferentes alvos moleculares (Ullah 2008). A P-gp tem um papel fulcral no desenvolvimento da MDR, conferindo resistência mediando o efluxo dependente de ATP de um grande número de compostos (Callaghan, Luk et al. 2014).

Em casos de células neoplásicas a P-gp pode-se encontrar sobreexpressa em resposta à quimioterapia, sendo assim um obstáculo ao tratamento. No caso da leucemia mieloide aguda a sobreexpressão ocorre em cerca de um terço dos novos casos. A sobreexpressão nestes casos está associada com a redução na acumulação de agentes

citotóxicos e, conseqüentemente, destruição ineficaz de blastos (Gerrard, Payne et al. 2004).

Um estudo realizado por Gerrard et al. (2004) avaliou os efeitos do zosuquidar trihidroclorido (Z3HCL) e a sua influência na atividade da P-gp em pacientes com leucemia mieloide aguda. Este Z3HCL é um inibidor de terceira geração seletivo da P-gp que, rápida e eficazmente, inibe o efluxo de compostos ligando-se alostericamente à P-gp e inativa o efluxo de compostos (Gerrard, Payne et al. 2004). Neste estudo foi coadministrado Z3HCL juntamente com daunorrubicina e arabinoside cistossina que são dois fármacos antineoplásicos utilizados normalmente no tratamento da leucemia mieloide aguda.

Os resultados obtidos a partir deste estudo permitiram verificar que a Z3HCL é bem tolerada em combinação com outros compostos farmacêuticos, tendo sido notado no entanto que pode provocar alguma toxicidade neurológica quando administrada em combinação com outros fármacos citotóxicos, que pode estar relacionado ou com a ação dos fármacos citotóxicos ou com a incapacidade de realizar o efluxo de toxinas ou metabolitos (Gerrard, Payne et al. 2004).

O VER, bloqueador dos canais de cálcio, foi o primeiro agente descoberto que supera a resistência aos antraciclinos e alcaloides vinca mediada pela P-gp. Em estudos previamente realizados verificou-se que o VER supera a MDR e aumenta a sensibilidade dos fármacos citotóxicos anticancerígenos em mielomas que não respondem à terapia e em Linfomas não-Hodgkin (Belpomme, Gauthier et al. 2000).

Um estudo realizado por Belpomme et al. (2000) avaliou o efeito da administração do VER associado com os outros agentes quimioterapêuticos em pacientes com carcinoma de mama metastático resistente a antraciclinos (*anthracycline-resistant Metastatic Breast Carcinoma*, MBC). Foi possível verificar, através deste estudo, que o VER aumentou a eficácia do tratamento anti-tumoral em pacientes com MBC. Apesar do efeito ser limitado no tempo e amplitude, é recomendado a adição do VER ao tratamento quimioterapêutico, pois aumenta a taxa de sobrevivência destes pacientes que têm sempre um prognóstico muito reservado (Belpomme, Gauthier et al. 2000).

Em conclusão a P-gp afeta a disposição de muitos compostos farmacêuticos, tendo uma grande contribuição na ADME destes mesmos compostos e, conseqüentemente, estando implicada em potenciais interações farmacocinéticas fármaco-fármaco. A P-gp tem particular importância no epitélio intestinal onde tem um papel crucial na extrusão de fármacos do sangue para o lúmen intestinal e, ao mesmo

tempo, prevenindo que fármacos passem do lúmen intestinal para a corrente sanguínea, reduzindo assim a sua absorção e BD (Mealey 2004, Zhou 2008).

2.3.8 Polimorfismo P-gp

A expressão da P-gp no homem sofre uma grande variabilidade de indivíduo para indivíduo, podendo ocorrer polimorfismos [Polimorfismos de Nucleótido Simples (SNP) e inserções/deleções] do gene ABCB1 parecendo alguns deles alterar a expressão de mRNA, a expressão proteica e a função da P-gp e podendo ser responsáveis pela variação de resposta a um fármaco entre diferentes indivíduos e populações (Hoffmeyer, Burk et al. 2000).

A influência de variações genéticas no gene MDR1 na expressão da P-gp foi já investigada revelando vários SNP com capacidade para influenciar a função da P-gp, a eficácia terapêutica e a BD de alguns agentes farmacológicos. Esta expressão é particularmente importante na terapia de cancro onde a alta expressão e atividade da MDR1 faz com que as células, quando se encontram sobre ação de substratos da P-gp, se tornem resistentes ao tratamento (Hoffmeyer, Burk et al. 2000).

A atividade global da MDR1 no controlo do transporte de fármacos depende de dois parâmetros:

- Do nível de expressão do gene MDR1, que controla a quantidade de proteína que é sintetizada nas células;
- Da funcionalidade do MDR1 em codificar a P-gp, que determina o reconhecimento e a eficácia do transporte dos substratos (Hoffmeyer, Burk et al. 2000).

O primeiro parâmetro foi extensivamente estudado, particularmente devido à sensibilidade das células tumorais para a quimioterapia estarem inversamente relacionadas com o aumento da expressão de MDR1 (Hoffmeyer, Burk et al. 2000). Este aumento pode ser atribuído parcialmente à amplificação de genes mas, outros fatores, podem ser a causa dessa sobre expressão nomeadamente as diferenças alélicas nas sequências de MDR1.

Diferenças sequenciais no promotor e/ou potenciador podem influenciar os níveis de expressão. As regiões do gene MDR1 que podem influenciar os níveis de expressão são:

- Promotor – sequências que influenciam o modo ou eficácia de processamento do pré – mRNA;
- Potenciador – sequências que influenciam a estabilidade do mRNA (Hoffmeyer, Burk et al. 2000).

O segundo parâmetro que influencia atividade global da MDR1 em indivíduos é a funcionalidade da P-gp. Este parâmetro é definido pela sequência de aminoácidos da proteína, codificada pelo alelo MDR1, podendo alterações de aminoácidos influenciar a função da P-gp (Hoffmeyer, Burk et al. 2000).

Efeitos terapêuticos de um determinado fármaco mostram diferenças interindividuais que podem ser explicadas em parte pela variabilidade na expressão de transportadores dos fármacos nos diferentes tecidos. Esta variabilidade pode resultar do polimorfismo dos genes dos transportadores ABC (Lucie Couture 2007).

3. Intestino – Introdução

O principal local de absorção de fármacos administrados oralmente é o intestino delgado. Este órgão tem, aproximadamente, 3 metros de comprimento e um diâmetro entre 3 a 4 centímetros, sendo constituído por 3 secções: duodeno, jejuno e íleo, cuja percentagem de comprimento do intestino delgado é 5, 50 e 45% respetivamente (Sinko 2007).

O intestino é constituído por células epiteliais intestinais, população heterogénea de células que inclui enterócitos ou células absortivas, células caliciformes que segregam mucina, células endócrinas, células Paneth, células-M entre outras (Sinko 2007).

Os enterócitos, população celular que se encontra em maior número nas vilosidades intestinais, são células polarizadas com membrana apical e basolateral distintas, que se encontram separadas por junções estreitas e que são responsáveis pela absorção de grande parte dos nutrientes e fármacos pelo facto de estarem equipadas

com uma vasta gama de transportadores de influxo na membrana apical (Sinko 2007, Russel 2010).

A maioria dos compostos que estão disponíveis no mercado farmacêutico é administrada pela via oral, que é a mais conveniente e que têm um custo de administração rentável (Ayman and Manthena 2012). Assim sendo, a BD oral é um dos principais critérios na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos sendo o resultado o produto da fração absorvida, fração perdida via eliminação intestinal e fração perdida via eliminação hepática (Engman 2003, Ayman and Manthena 2012).

É reconhecido que a baixa BD é uma das maiores causas de variabilidade terapêutica, sendo este fator particularmente importante para fármacos com uma janela terapêutica muito estreita ou com um potencial de desenvolvimento de resistência contra antibióticos e fármacos citotóxicos (Engman 2003). Assim, a absorção intestinal de fármacos administrados oralmente é influenciada por vários fatores:

1. Propriedades físico-químicas das moléculas do composto (ex: lipofilia, solubilidade, estabilidade, ionização);
2. Fatores farmacológicos (ex: taxa de desintegração e dissolução, formulação e dosagem);
3. Fatores fisiológicos (ex: motilidade intestinal, enzimas metabólicas e transportadores) (Sinko 2007).

Como pode ser visto, na **figura 4** a absorção intestinal e a BD após administração do composto são influenciadas por vários fatores (Engman 2003). O trato gastrointestinal representa assim a primeira linha de defesa contra a exposição oral a toxinas e fármacos, nos quais os fatores referidos anteriormente, juntamente com o efeito de 1ª passagem no fígado, são os maiores determinantes da BD de xenobióticos (Leslie, Deeley et al. 2005, Yoshida, Maeda et al. 2013).

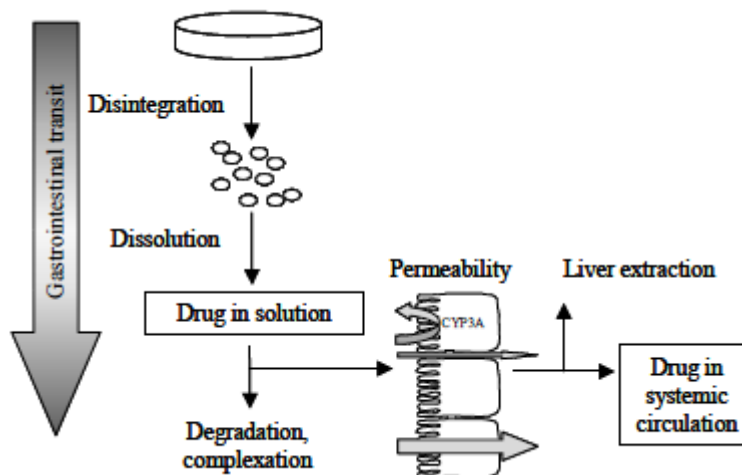


Figura 4 – Fatores que influenciam a absorção oral de compostos e a biodisponibilidade. Adaptado de (Engman 2003)

Assim que o composto farmacêutico é libertado da sua forma de dosagem passa a ser um composto solúvel e, como tal, para conseguir passar do lúmen intestinal para a circulação sanguínea ou linfática tem de passar por uma série de barreiras como o glicocálice (polissacarídeo - glicoproteico que reveste a membrana celular), a camada mucosa, microvilosidades presentes na membrana apical, membrana basolateral dos enterócitos entre outras (Sinko 2007, Zhou 2008). Pensa-se que a membrana apical e basolateral dos enterócitos juntamente com as junções estreitas representam a maior barreira para a passagem dos compostos. No entanto, foi provado *in vitro* que barreiras pré-epiteliais, como a camada mucosa ou o glicocálice podem afetar significativamente a taxa de absorção global de alguns compostos. (Sinko 2007, Zhou 2008)

3.1 Epitélio intestinal

Quando os compostos chegam ao intestino encontram uma sequência de barreiras durante o seu transporte do lúmen intestinal para o sangue. A parte da membrana plasmática que reveste o intestino, a superfície apical, é especializada na absorção, enquanto o resto da membrana plasmática, quer a membrana lateral quer a basal, normalmente referida como superfície basolateral, realiza o transporte de

nutrientes das células para os fluidos circundantes e entra em contacto com células adjacentes e a matriz extracelular designada lâmina basal (Lodish H 2000).

A superfície do trato gastrointestinal encontra-se coberta por células epiteliais que funcionam sobre condições fisiológicas como uma barreira de permeabilidade seletiva. O epitélio intestinal tem duas funções essenciais: prevenir a entrada de determinados compostos nocivos para o organismo e permitir a translocação de compostos essenciais como nutrientes, eletrólitos e água do lúmen intestinal para a circulação. O epitélio intestinal realiza a permeabilidade seletiva por duas vias: via transepitelial/transcelular e via paracelular (Groschwitz and Hogan 2009, Iizuka and Konno 2011).

A unidade funcional do epitélio intestinal são as vilosidades intestinais que apresentam na base as criptas de Lieberkühn (**figura 5**). Nestas estruturas o epitélio encontra-se espacialmente separado em células proliferativas e diferenciadas, na zona basal e na zona superior das criptas respetivamente, situando-se na ponta das vilosidades células funcionais e absorptivas (enterócitos) (Pageot, Perreault et al. 2000, Engman 2003).

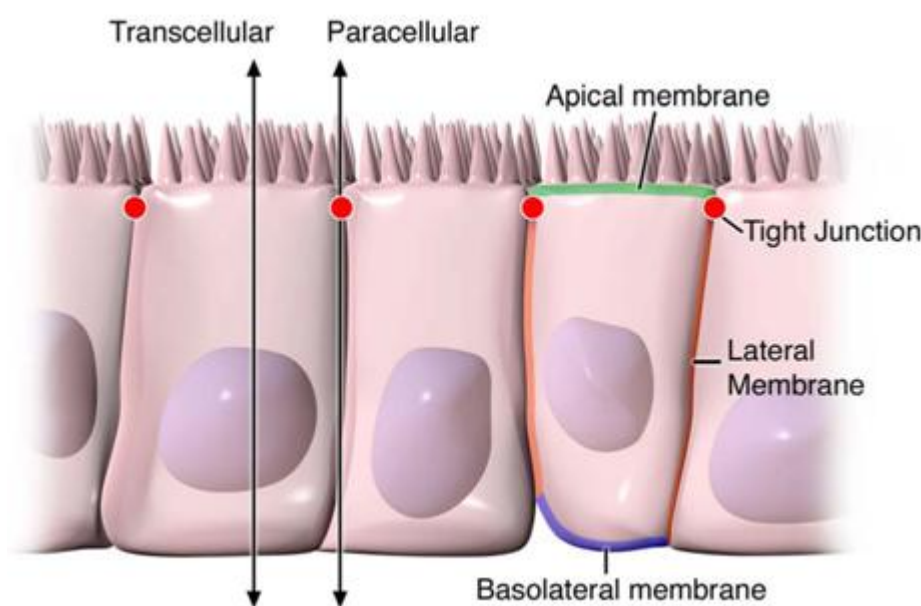


Figura 5 – Vias de permeabilidade intestinal. Adaptado de (Groschwitz and Hogan 2009).

O epitélio intestinal contém 3 tipos de células com funções distintas: células endócrinas, exócrinas e absorptivas (enterócitos). As células endócrinas secretam peptídeos digestivos hormonais, enquanto as exócrinas secretam muco (células goblet) ou peptídeos antimicrobianos (células paneth). Os enterócitos são as células mais abundantes sendo cerca de 80 a 90% do número total de células epiteliais.

Os três grupos de células diferenciadas são originados das mesmas células estaminais multipotenciais que proliferam na parte basal das criptas (Engman 2003).

As propriedades relevantes para a absorção dos fármacos diferem entre células e ao longo da estrutura criptas-vilosidades (Engman 2003). A superfície epitelial disponível para contacto com os compostos presentes no lúmen é amplificada por estruturas como dobras, vilosidades e microvilosidades (Engman 2003). Da superfície apical das células epiteliais intestinais são projetadas, com um diâmetro aproximado de 100 nanómetros, as microvilosidades. Estas estruturas aumentam de forma expressiva a área da superfície apical aumentando assim o número de proteínas de transporte que pode conter e, consequentemente, a capacidade absorptiva do epitélio intestinal. Uma série de filamentos de actina, presentes em cada microvilosidade, confere rigidez a estas projeções. Revestindo as microvilosidades encontra-se o glicocálice, uma rede composta de cadeias laterais de oligossacarídeos da membrana integral das glicoproteínas, glicolípidos e enzimas que catalisam as últimas etapas da digestão de carboidratos e proteínas ingeridas. A ação destas enzimas produz monossacarídeos e aminoácidos, que são transportados através do epitélio intestinal, eventualmente, para a via sanguínea (Lodish H 2000).

O contacto entre células epiteliais intestinais inclui três componentes que podem ser identificados a nível ultraestrutural: desmossomas, junções aderentes e junções estreitas (**figura 6**). As duas primeiras pensa-se que são importantes na ligação mecânica de células adjacentes (Groschwitz and Hogan 2009). Já as junções estreitas são um complexo responsável por “fechar” o espaço intercelular e regular assim o transporte seletivo de compostos através do transporte paracelular. As junções aderentes e estreitas pensa-se que também estejam envolvidas na regulação da proliferação, polarização e diferenciação celular (Groschwitz and Hogan 2009).

A expressão das proteínas juncionais no intestino é altamente regulada e dependente do compartimento intestinal (intestino delgado, grosso), localização das vilosidades/criptas e especificidade da membrana celular (apical, lateral e basolateral). O complexo padrão de expressão das junções estreitas no intestino está relacionado com a função específica de uma região intestinal em particular (Groschwitz and Hogan 2009). A taxa e extensão da absorção intestinal são dependentes da permeabilidade intestinal do fármaco e da área de superfície epitelial (Artursson and Karlsson 1991, Fagerholm and Lennernäs 1995, Engman 2003).

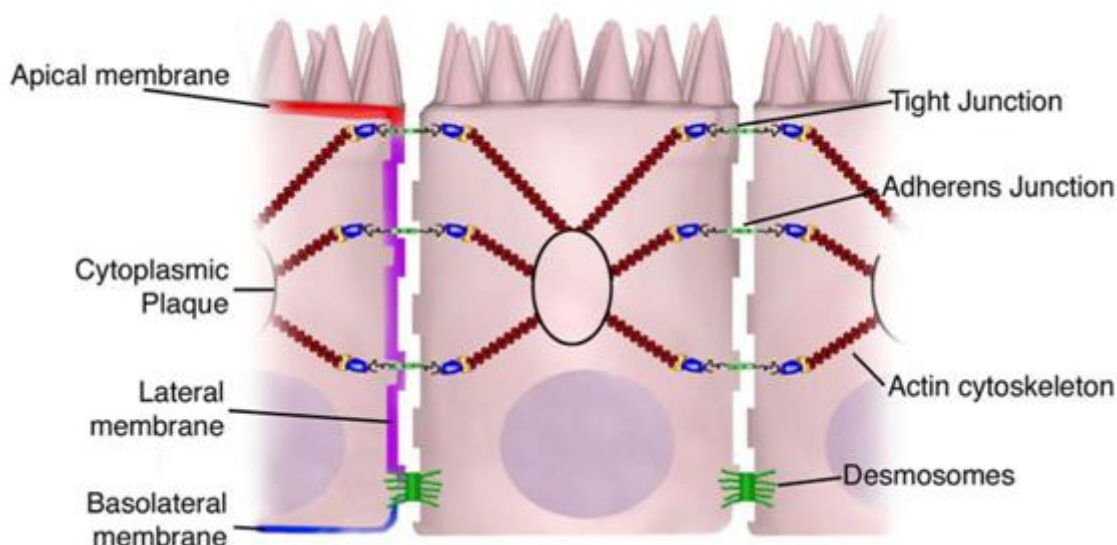


Figura 6 – Complexo de junções epiteliais intestinais. Adaptado de (Groschwitz and Hogan 2009).

3.2 Permeabilidade do Intestino

O transporte de moléculas farmacêuticas através das células epiteliais intestinais, especificamente através dos enterócitos, pode ocorrer de várias formas:

- **Difusão transcelular** – Transporte de compostos através da membrana apical e basolateral dos enterócitos sem consumo de Adenosina Trifosfato (ATP), resultante do transporte ocorrer por diferença de gradiente de concentração movendo-se o composto da zona de maior concentração para a de menor concentração. Este tipo de transporte é característico de moléculas lipófilas com um tamanho reduzido ou moderado (Engman 2003, Sinko 2007);
- **Difusão paracelular** – Transporte que ocorre apenas em células de pequena dimensão que se baseia na passagem de moléculas pelos espaços existentes entre as células epiteliais intestinais. Este transporte é limitado pelo facto das células se encontrarem ligadas por junções estreitas criando uma espécie de barreira a este tipo de transporte (Engman 2003, Sinko 2007);

A difusão paracelular é característica de fármacos hidrofílicos, de pequenas dimensões que conseguem penetrar o epitélio intestinal por esta via. Para além disso, os fármacos catiónicos são mais permeáveis do que os fármacos aniónicos ou neutros. Este mecanismo é mais frequente na parte superior do intestino do que na parte inferior e no cólon (Karlsson, Ungell et al. 1999, Engman 2003);

- **Transcitose** – Processo através do qual os compostos entram nas células sem passarem pela membrana fosfolípídica, podendo ocorrer por fagocitose, pinocitose e endocitose mediada por recetores. A endocitose de uma substância no intestino pode potencialmente levar a uma subsequente transcitose através das células epiteliais

intestinais (as substâncias entram pelas células epiteliais por um lado e migram pela célula para saírem pelo outro lado). Este tipo de transporte descreve a absorção de algumas macromoléculas como imunoglobulinas e vitamina B12. (Sinko 2007, Russel 2010);

- **Transporte mediado** – As células intestinais absorptivas expressam uma grande variedade de sistemas que têm um papel na determinação da exposição das células a uma variedade de solutos incluindo nutrientes (péptidos, aminoácidos, açúcares). O transporte mediado pode ser direto ou indiretamente dependente da energia (Engman 2003). Um vasto número de transportadores ABC e de transportadores de aniões orgânicos e de cationes orgânicos foram identificados no intestino e têm grande impacto na absorção intestinal (Engman 2003).

3.3 Transportadores no intestino delgado

Foram descritos vários transportadores intestinais, pertencendo a maioria deles a duas superfamílias de transportadores, transportadores ABC e transportadores SLC (**tabela 4**) (Sinko 2007, Russel 2010).

Tabela 4 – Transportadores ABC e SLC presentes no intestino delgado. Adaptado de (Russel 2010).

Transportadores ABC	Transportadores SLC
ABCB1 (P-gp)	SLCO1A2 (OATP1A2)
ABCC1 (MRP1)	SLC02B1 (OATP2B1)
ABCC2 (MRP2)	SLC22A1 (OCT1)
ABCC3 (MRP3)	SLC15A1 (PEPT1)
ABCG2 (BCRP)	SLC 22A4 (OCTN1)

3.3.1 Transportadores SLC

Outra família de transportadores envolvida na absorção e distribuição de fármacos é a família SLC. Os membros pertencentes à superfamília SLC são responsáveis pelo transporte de uma variedade de compostos endógenos e exógenos como aminoácidos, glicose, oligopéptidos, antibióticos, entre outros (Sinko 2007). Em relação a esta família, estão presentes no intestino, transportadores da subfamília *Solute carrier organic anion*

transporter familie (SLCO Subfamília) como o SLCO1A2/OATP1A2 (OATP-A) e o SLCO2B1/OATP2B1 (OATP-B), OATP-D (SLC21A11), Solute carrier family 15 (SLC15A subfamília) como SLC15A1 (PepT1) (Kobayashi, Nozawa et al. 2003, Sinko 2007, Russel 2010). Foi descrita a presença destes transportadores na membrana apical dos enterócitos havendo no entanto variação da sua expressão ao longo do trato gastrointestinal, sendo necessários mais estudos para confirmação, com exceção do PepT1 que é expresso de forma predominante no intestino delgado (Sinko 2007, Russel 2010).

Os membros da família OATP que foram detetados no intestino humano e que estão relativamente bem estudados são o OATP-A e o OATP-B. O OATP-A foi, inicialmente, detetado no fígado e de forma predominante na BHE, nas células endoteliais dos capilares cerebrais e, em menor concentração, no intestino (Sinko 2007). Apesar de estudos imunohistoquímicos não terem permitido com precisão determinar qual a localização da OATP-A na membrana apical das células intestinais, estudos *in vivo* sugerem que a OATP-A está localizada no lado apical das células epiteliais intestinais funcionando como um transportador absorptivo. O OATP-A realiza o transporte de compostos como fexofenadina e saquinivir (Dresser, Bailey et al. 2002, Sinko 2007).

Quanto ao OATP-B este é expresso em vários tecidos incluindo o intestino delgado e o fígado, tendo alta especificidade de substratos. Imunohistoquimicamente foi possível verificar a presença da OATP-B na membrana apical dos enterócitos do intestino delgado sendo o único OATP que se encontra presente na membrana apical dos enterócitos. No entanto são necessários mais estudos para identificar qual a função e a sua variação de expressão ao longo do intestino delgado (Kullak-Ublick, Ismail et al. 2001, Kobayashi, Nozawa et al. 2003).

3.3.2 Transportadores ABC

Em relação à família de transportadores ABC, estes estão presentes em grande concentração no intestino, na superfície apical. Os transportadores ABCB1 (P-gp), ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2), ABCC3 (MRP3) assim como o ABCG2 (BCRP) revestem o intestino onde têm função de limitar a BD oral de vários substratos e, assim, bombear compostos de volta para o lúmen intestinal limitando a extensão da absorção (Sinko 2007, Russel 2010). Estudos demonstram que os níveis de expressão dos

transportadores ABC variam ao longo do trato gastrointestinal, o que pode influenciar a absorção do composto. A BCRP é encontrada em concentrações elevadas ao longo do intestino e cólon, enquanto a expressão da MRP2 é maior no duodeno, diminuindo até se tornar indetetável na zona terminal do íleo e cólon (Dietrich, Geier et al. 2003, Sinko 2007, Russel 2010).

O transportador MRP1 é encontrado na superfície basolateral das criptas de Lieberkühn, local de renovação dos enterócitos, pensando-se que tem influência na manutenção de um ambiente favorável à proliferação celular e, ao mesmo tempo, na proteção da camada celular ao dano induzido por xenobióticos. Este transportador não é encontrado nos enterócitos das vilosidades intestinais. Já a expressão de MRP3 é alta tanto no duodeno, como íleo e cólon (Dietrich, Geier et al. 2003, Leslie, Deeley et al. 2005, Sinko 2007).

A expressão da P-gp aumenta gradualmente do duodeno para o cólon e os níveis de expressão de RNA no cólon são similares aos presentes no íleo que é aproximadamente 6 vezes superior aos do duodeno. Este transportador está expresso na membrana apical das células epiteliais colunares da superfície do intestino delgado e do intestino grosso (Schinkel 1997, Leslie, Deeley et al. 2005, Sinko 2007). Foi também demonstrado que os polimorfismos genéticos da MDR1/P-gp e BCRP podem afetar os níveis de expressão e a função destes transportadores, ao mesmo tempo, que influenciam a BD e a absorção de um número variado de substratos (Russel 2010).

Dentro dos transportadores ABC a P-gp, MRP2 e BCRP estão expressos tanto no intestino como no fígado podendo assim reduzir a BD oral dos compostos por dois mecanismos: a inibição direta da absorção para fora do intestino e a rápida eliminação dos xenobióticos e dos seus metabolitos pela bile (Dietrich, Geier et al. 2003). A ausência de transportadores ABC a nível intestinal leva a um aumento da absorção dos xenobióticos para a veia porta resultando também num aumento dos níveis destes compostos no sangue e órgãos (Dietrich, Geier et al. 2003).

A falta de eliminação hepática origina uma acumulação de xenobióticos a nível hepático ou, como resultado da secreção basolateral dos hepatócitos para a circulação sistêmica, valores sistêmicos elevados e também aumento da concentração em órgãos adjacentes (Dietrich, Geier et al. 2003).

3.4 Transporte mediado por P-gp

A P-gp é o transportador responsável pelo transporte de um grande número de compostos terapêuticos com diferentes tipos de estruturas e atividade farmacológica. No

entanto, a sua distribuição não é uniforme entre as células ao longo das vilosidades epiteliais.

Foi postulado que, devido à alta concentração de P-gp/MDR1 nas células epiteliais que revestem o intestino, este transportador pode alterar a absorção e a BD de compostos administrados oralmente (Zhou 2008).

Estudos imunohistológicos no cólon e jejuno humano usando o anticorpo MRK16 revelaram que apenas foram observados níveis altos de P-gp na superfície apical das células epiteliais colunares mas não nas células das criptas de Lieberkühn (Lin and Yamazaki 2003). A distribuição da P-gp também não é uniforme ao longo de todo o intestino. Fojo et al (1987) realizou a avaliação da expressão do MDR1 mRNA ao longo do intestino verificando que os níveis de mRNA parecem aumentar progressivamente do estômago para o cólon, com baixos valores no estômago, níveis intermédios no jejuno e níveis elevados no cólon (Fojo, Ueda et al. 1987, Lin and Yamazaki 2003)

A importância da P-gp na absorção intestinal de compostos administrados oralmente é também apoiada por várias provas usando ratinhos sem P-gp. Ao contrário dos humanos, os ratinhos têm dois genes (*mdr1a*, *mdr1b*) em vez de um só (MDR1). Estudos demonstram que a transcrição da *mdr1a* e *mdr1b* é diferente variando entre os tecidos ou órgãos específicos, com a *mdr1a* a estar altamente expressa em células epiteliais intestinais e na BHE e barreira sangue-testículos, enquanto o *mdr1b* é altamente expressa na glândula adrenal, úteros de grávidas e ovários. Ambos os genes estão expressos, substancialmente, em vários outros tecidos, como o fígado, rim, pulmão, coração e baço (Sinko 2007).

Foi possível demonstrar que ratinhos sem o gene *mdr1a* presente estão mais suscetíveis a desenvolver doença inflamatória intestinal e têm maior incidência de colites que podem ser prevenidas por tratamento com antibióticos. Assim sendo, pensa-se que a P-gp previne a acumulação de bactérias indutoras da inflamação e dos produtos bacterianos (ten Hove, Drillenburger et al. 2002, Leslie, Deeley et al. 2005).

O efluxo mediado pela P-gp reduz a exposição ao fármaco através da prevenção da entrada de xenobióticos no corpo humano e/ou facilitando a sua eliminação para fora do corpo. No entanto, o efluxo da P-gp intestinal pode não ter um papel significativo na BD oral de certos compostos, mesmo que tenha sido demonstrado que sejam substrato da P-gp.

A maioria dos compostos transportados pela P-gp são também substratos da fase I metabólica do CYP3A4. A coexpressão destas duas proteínas no intestino e o trabalho mútuo dificulta a percepção da contribuição das duas proteínas para a absorção do fármaco. É normalmente aceite que as enzimas metabólicas intestinais e os

transportadores de efluxo trabalham de forma coordenada como um sistema de destoxificação resultando em baixa BD de certos compostos (Benet, Cummins et al. 2004, Sinko 2007).

3.4.1 Sobreposição CYP3A4 e P-gp

Outro aspeto interessante no que diz respeito à indução da P-gp é a potencial existência de um mecanismo de co-regulação tanto da expressão da P-gp como da CYP3A4 (Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

Como sabemos a P-gp está expressa em células epiteliais de tecidos com função de secreção ou excreção, assim como nas células endoteliais de capilares das barreiras sangue-tecido, tendo por isso grande influência na ADME dos xenobióticos (Silva, Vilas-Boas et al. 2015). No entanto, ao mesmo tempo, o metabolismo e eliminação de xenobióticos envolve também reações enzimáticas catalisadas por enzimas pertencentes ao CYP P450 (Silva, Vilas-Boas et al. 2015). Podemos, assim, afirmar que a biotransformação mediada pela CYP3A4 e o efluxo ativo de fármacos absorvidos pela P-gp são os maiores determinantes da BD de fármacos administrados oralmente (Kolars, Lown et al. 1994, Kivisto, Niemi et al. 2004).

Foi em 1995 que, pela primeira vez, se colocou a hipótese de uma possível interação entre a P-gp e a CYP450, nomeadamente a CYP3A4, com base no estudo das suas localizações tanto no fígado como no intestino, assim como na sua localização genética. Curiosamente, ambos os genes estão localizados no mesmo cromossoma. Enquanto a CYP3A4 se localiza na posição identificada por 7q22.1, o gene MDR1 está localizado na posição identificada por 7q21.1 (Wacher, Wu et al. 1995, Cummins, Jacobsen et al. 2002).

O CYP3A4, sendo a isoforma mais expressa da subfamília CYP3A, é uma das enzimas mais importantes no que toca à metabolização de fármacos. Esta isoenzima tem um espectro muito alargado de substratos e está envolvida no metabolismo de fase I de aproximadamente 50% dos fármacos. A nível de localização esta isoenzima está presente nos enterócitos, na mucosa do duodeno e do jejuno proximal que é rica em vilosidades e cujas extremidades se encontram revestidas por enterócitos com CYP3A4 maduros e também no fígado. A localização estratégica desta isoenzima indica o primeiro local onde ocorre o metabolismo de compostos que são ingeridos oralmente (Thiebaut, Tsuruo et al. 1987, Paine, Khalighi et al. 1997, Kivisto, Niemi et al. 2004, von Richter, Burk et al. 2004).

Ficou demonstrado que a biotransformação mediada pelo CYP3A4 na parede intestinal contribui, de forma substancial, para o metabolismo de primeira passagem de

um grande número de compostos terapêuticos (von Richter, Greiner et al. 2001, Kivisto, Niemi et al. 2004). Ao mesmo tempo, a partir de uma investigação, concluiu-se que os níveis de CYP3A4 em enterócitos isolados da mucosa do duodeno ou jejuno são superiores quando comparados com os níveis de CYP3A4 no fígado. Este estudo, apesar de necessitar de maior fundamentação, pode induzir que o metabolismo na parede intestinal contribui de forma substancial para o metabolismo de primeira passagem de muitos substratos do CYP3A4 (Kolars, Lown et al. 1994, von Richter, Burk et al. 2004).

A CYP3A4 e a P-gp podem atuar de forma sinérgica no intestino delgado de forma a limitar a BD oral dos compostos, o que pode ser comprovado não só pela sua presença tanto nos locais de absorção como de eliminação, mas também pela sua grande sobreposição de especificidade de substratos (**tabela 5**) (Kivisto, Niemi et al. 2004, von Richter, Burk et al. 2004).

Ambas as estruturas são responsáveis pelo metabolismo de mais de metade dos xenobióticos conhecidos tornando-os mais reativos a fim de serem conjugados com moléculas endógenas (ex: glutatona, glucoronídeos) ajudando o organismo a libertar-se dos mesmos. A sobreposição na localização, na seletividade em relação aos substratos, inibidores e indutores da P-gp e CYP3A4, parecem demonstrar que o transportador e o sistema enzimático atuam de forma coordenada formando uma dupla barreira contra os xenobióticos (Collett, Higgs et al. 1999, Benet and Cummins 2001). Esta ação conjunta do metabolismo intestinal pelo CYP3A4 e o efluxo ativo da P-gp são processos importantes na limitação do transporte transcelular de numerosos compostos via células epiteliais intestinais (Yoshida, Maeda et al. 2013).

A interação entre a P-gp e a CYP3A4 pode ser explicada por vários mecanismos, que se encontram enunciados de seguida (Christians 2004).

Tanto a CYP3A4 como a P-gp são sincronizados pelo recetor nuclear X-pregnano (SXR/PXR). Esta regulação coordenada resulta num sistema acoplado de transporte e biotransformação de fármacos e outros xenobióticos (Choudhuri and Klaassen 2006, Silva, Vilas-Boas et al. 2015). Ficou demonstrado que o paclitaxel é capaz de induzir ambas as proteínas nos hepatócitos por um mecanismo envolvendo a interação específica com o PXR (Silva, Vilas-Boas et al. 2015). Ficou também demonstrado que o PXR também induz a expressão tanto do CYP3A4 e MDR1 noutros tecidos como a BHE, assim como em linhas celulares intestinais (Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

Apesar da PXR ser expressa principalmente no fígado e tecidos intestinais, a sua expressão foi também detetada no cancro da mama, da próstata e gastrointestinal. Ativação da PXR no cancro da mama e da próstata foi reportada como estimulador da

expressão do CYP3A4 e da MDR1 aumentando assim a resistência das células cancerígenas contra a quimioterapia (Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

Estudos realizados em animais e humanos parecem comprovar que a função da P-gp pode permitir ao CYP3A4 ter acesso repetido e prolongado às suas moléculas de substratos (**figura 7**) (Benet, Izumi et al. 1999, Kivisto, Niemi et al. 2004). Os compostos que não são sujeitos à ação da P-gp podem passar por difusão passiva para o enterócito apenas uma vez seguindo para a veia porta, enquanto os compostos que não seguem diretamente para a corrente sanguínea, podem sofrer ação da CYP3A4 ou ser excretado pela P-gp de volta para o lúmen intestinal (Benet and Cummins 2001).

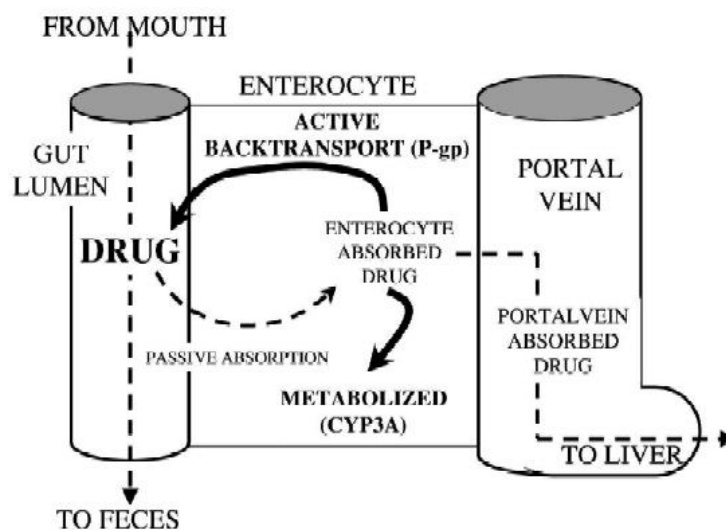


Figura 7 – Ciclo do substrato da P-gp e CYP3A4 e potencial para o transportador controlar o acesso à enzima. Adaptado de (Benet and Cummins 2001).

As moléculas sujeitas ao efluxo da P-gp podem estar continuamente a passar do enterócito para o lúmen intestinal permitindo à enzima CYP3A ter acesso repetido ao composto ou podem mesmo não ser absorvidas devido ao seu efluxo (**figura 8**) (Benet and Cummins 2001).

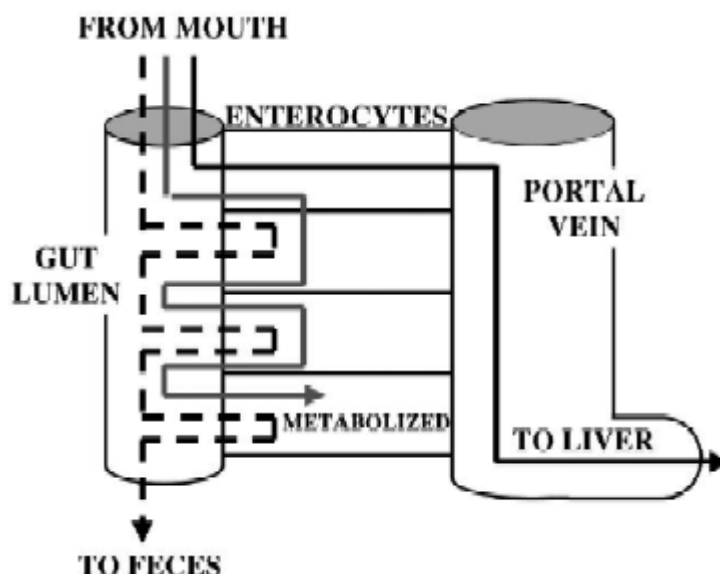


Figura 8 – Efeitos potenciais do efluxo da P-gp no acesso a fármacos pela CYP3A4. Adaptado de (Benet and Cummins 2001).

A P-gp pode também prevenir a interação de determinados metabolitos gerados pela CYP3A4 com essa mesma enzima através da sua expulsão dos enterócitos (Benet and Cummins 2001, Kivisto, Niemi et al. 2004).

Os compostos que são substratos tanto da P-gp como da CYP3A4 têm normalmente uma baixa BD (Kivisto, Niemi et al. 2004). É de notar que a referida sobreposição de substratos não é completa uma vez que há substratos CYP3A4 que não são transportados pela P-gp (Ex: midazolam) e há ainda substratos da P-gp que não sofrem ação do sistema CYP3A4 (ex: digoxina, talinolol) (Choudhuri and Klaassen 2006). Além disso, nem todos os membros de uma classe terapêutica interagem da mesma forma com a P-gp. Entre os antagonistas dos canais de cálcio, por exemplo o VER e o diltiazem parecem ser transportados pela P-gp. No entanto, a nifedipina substrato CYP3A4 não é substrato da P-gp.

Outro mecanismo que ajuda a explicar a interação entre a CYP3A4 e a P-gp reside no facto de a P-gp manter as concentrações intracelulares dos compostos dentro do intervalo no qual as CYP atuam.

Cummins et al. (2002), recentemente, tentou estabelecer a contribuição e influência da P-gp para o metabolismo de fármacos pelo CYP3A4. Foi descoberto que quando a P-gp é inibida a extensão do metabolismo pela CYP3A4 e o metabolismo do substrato da P-gp decrescem, permitindo assim concluir que a P-gp pode atuar em conjunto com a CYP3A4 para aumentar a extensão do metabolismo do fármaco, através do controlo do acesso do fármaco à isoenzima metabolizadora intracelular (Cummins, Jacobsen et al. 2002, Kivisto, Niemi et al. 2004).

Existe a possibilidade de a CYP3A4 e a P-gp trabalharem de forma coordenada para formar uma barreira contra absorção de xenobióticos, no entanto, é necessário que sejam realizados mais estudos de forma a perceber como funciona esse mecanismo (Kivisto, Niemi et al. 2004). Apesar do mecanismo subjacente à co regulação dos genes da CYP3A e MDR1 permanecer ainda por esclarecer o estudo de tal interação é interessante por duas razões:

- a) CYP3A e a P-gp têm substratos comuns incluindo fármacos usados para reverter a MDR;
- b) Os dois genes estão normalmente sobreexpressos no mesmo tecido humano como fígado, pulmões e cólon (Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

Assim sendo, esta sobreposição da CYP3A e MDR1 sugere que possam trabalhar em conjunto para limitar ou modificar a BD de um grande número de fármacos e xenobióticos e o desenvolvimento de indutores pode constituir uma nova e mais eficaz via contra substratos tóxicos da P-gp que são também destoxificados através da CYP3A (Silva, Vilas-Boas et al. 2015).

O metabolismo a nível intestinal realizado pelo CYP450 é reconhecido como um determinante muito importante na limitação da BD dos fármacos. A CYP3A é a enzima pertencente ao grupo enzimático CYP450 que se encontra mais presente a nível intestinal, encontrando-se nas células epiteliais colunares que revestem o lúmen intestinal (Cummins, Jacobsen et al. 2002).

Apesar de em relação ao fígado a CYP3A4 encontrar-se em baixa concentração no intestino, o metabolismo de primeira passagem no intestino ficou demonstrado num estudo em pacientes que esta enzima é muito importante na disposição do midazolam e ciclosporina (Cummins, Jacobsen et al. 2002).

No enterócito a separação espacial da P-gp, localizada na membrana plasmática apical, e da CYP3A4 localizada no retículo endoplasmático suporta a ideia que a P-GP pode controlar o acesso de compostos ao metabolismo intracelular da CYP3A4 (Cummins, Jacobsen et al. 2002).

Os compostos que são absorvidos no epitélio intestinal podem interagir com a P-gp e ser ativamente expulsos de novo para o lúmen intestinal. Se este processo, de difusão e de transporte ativo, ocorrer repetidamente a circulação de compostos do lúmen para o compartimento intracelular pode prolongar potencialmente o tempo de residência intracelular do composto, diminuir a taxa de absorção e como resultado um aumento no metabolismo do composto pela CYP3A4 relativamente ao composto parente que atravessa o intestino. Esta hipótese está suportada por um modelo de estimulação assim como estudos experimentais (Cummins, Jacobsen et al. 2002).

Tabela 5 – Substratos P-gp e CYP3A4. Adaptado de (Kivisto, Niemi et al. 2004).

Substrato P-gp	Substrato CYP3A4*	Substrato P-gp	Substrato CYP3A4*
Agentes Anticancerígenos		Beta-Bloqueadores	
Docetaxel	+	Bunitrolol	-
Etaposide	+	Carvadilol	+
Imatinib	+	Celiprolol	-
Paclitaxel	+	Talinolol	-
Teniposide	+	Bloqueadores Canais Cálcio	
Vinblastina	+	Diltiazem	+
Fármacos cardiovasculares		Mibefradil	+
Digitoxina	-	Verapamilo	+
Digoxina	-	Inibidores Protease VIH	
Quinidine	+	Amprenavir	+
Corticoesteroides		Indinavir	+
Dexametashone	+	Nelfinavir	+
Methylprednisolone	+	Saquinavir	+
Imunosupressores		Ritonavir	+
Cyclosporin	+	Fármacos Antieméticos	
Sirolimus	+	Ondasentron	+
Tacrolimus	+	Antibióticos	
Estatinas		Eritromicina	+
Atovastin	+	Levofloxacina	-
Lovastatin	+	Antihistamínicos	
Outros fármacos		Fexofenadine	-
Amitriptilina	+	Terfenadine	+
Itraconazole	+		
Losartan	-		
Morfina	+		
Fenitoína	-		
Rifampicina	+		

* indica se o substrato da P-gp são (+) ou não (-) substratos da CYP3A4

3.5 Transporte Mediado pela BCRP

A BCRP tem uma distribuição tecidual ampla, tendo sido o transportador descoberto na membrana canalicular dos hepatócitos e no intestino delgado mais propriamente, na membrana apical do cólon onde limita absorção de fármacos e/ou facilita a secreção para o lúmen (Dietrich, Geier et al. 2003, Sinko 2007).

Jonker et al. (2002) comparou a BD de um fármaco anticancerígeno (topotecan) em ratos sem o gene BCRP e descobriu que a AUC do fármaco administrado oralmente é, aproximadamente seis vezes maior em ratos sem o gene BCRP quando comparado com os ratinhos com o gene BCRP. Inibindo o BCRP através do composto GF120918 resulta também num aumento da absorção oral de topotecan. Subsequentemente, este fármaco em combinação com GF120918 demonstrou um aumento da BD oral (Jonker, Smit et al. 2000, Sinko 2007).

A BCRP restringe também a exposição a carcinogêneos como o 2-amino-1-metil-6-fenilimidazopiridina (PhIP). Segundo estudos a BCRP restringe efetivamente a exposição dos ratinhos ao PhIP através do decréscimo da sua absorção no intestino delgado e do aumento da sua secreção biliar e intestinal. Dado que a PhIP é a amina heterocíclica mais abundante em proteínas de vários alimentos, acredita-se que este transportador tem um papel fundamental na proteção contra a toxicidade de constituintes da alimentação. A importância do efluxo realizado pela BCRP, como agente responsável pela destoxificação no intestino, foi destacada também por Jonker et al. (2002) que descobriu que ratinhos sem BCRP estão mais predispostos a desenvolver lesões fototóxicas em áreas da pele expostas à luz, quando a dieta é constituída por grandes quantidades de clorofila (Jonker, Buitelaar et al. 2002, Sinko 2007)

3.6 Transporte mediado pelo MRP2

Descrito inicialmente como um transportador canalicular multiespecífico de aniões orgânicos, encontra-se presente na membrana apical dos hepatócitos e, a nível intestinal, nas extremidades das vilosidades intestinais, sendo a sua função mediar o transporte de vários aniões orgânicos, principalmente compostos conjugados, para a bile e, posteriormente, para fora do corpo (Dietrich, Geier et al. 2003). Excluindo os compostos conjugados, a MRP2 transporta também compostos anfipáticos sem carga o que indica uma grande amplitude de substratos deste transportador (Evers, de Haas et al. 2000, Dietrich, de Waart et al. 2001, Dietrich, Geier et al. 2003). Vários estudos mostram que a mediação do transporte de substratos catiónicos ou sem carga pela MRP2 pode ser estimulado pela presença de Glutathione reduzida (GSH) (Evers, de Haas et al. 2000, Dietrich, de Waart et al. 2001, Dietrich, Geier et al. 2003).

Este transportador não é só expresso no fígado e rins mas, também, ao nível das células epiteliais do intestino, nas vilosidades intestinais, apesar de a sua função no epitélio intestinal não se encontrar perfeitamente esclarecida (Fromm, Kauffmann et al. 2000, Dietrich, de Waart et al. 2001, Dietrich, Geier et al. 2003). A expressão do MRP2 no duodeno humano é induzida pela rifampicina, indicando uma possível interação na terapia por múltiplos fármacos (Fromm, Kauffmann et al. 2000, Dietrich, Geier et al. 2003). Foi demonstrado que essa indução é o resultado da sinalização por recetores nucleares que são induzidos por uma variedade de xenobióticos e que representa um mecanismo subjacente para diferenças adquiridas na expressão proteica deste transportador. Outro exemplo de alteração da expressão proteica são as patologias ao nível intestinal, como a doença de Crohn ou a doença celíaca que provoca deformações nas vilosidades intestinais conduzindo a uma diminuição da MRP2 intestinal e aumento da BD oral de substratos (Dietrich, Geier et al. 2003).

4. Barreira Hematoencefálica – Introdução

O tratamento de patologias do SNC ao longo dos anos permanece difícil de se realizar devido à dificuldade de muitos compostos atravessarem tanto a BHE como a barreira sangue – fluido cerebrospinal (BCSF). A passagem de compostos terapêuticos pela barreira pode realizar-se por diversos processos, incluindo, transcitose, endocitose mediada ou não por recetores, difusão passiva, difusão facilitada ou por transporte ativo (Lee and Bendayan 2004, Patrick T. Ronaldson 2007). Uma vez atravessada as barreiras, a acumulação de fármaco no cérebro está limitada ao efluxo passivo que ocorre dentro do fluido cerebrospinal (CSF), à degradação metabólica e/ou ao efluxo ativo de compostos.

Outro fator importante que contribui para a complexidade da disposição de xenobióticos no cérebro é a presença de estruturas celulares como os astrócitos, microglia, oligodendrócitos e neurónios que contribuem para a regulação e distribuição de fármacos e xenobióticos no SNC (Patrick T. Ronaldson 2007).

A BHE constitui uma barreira física e fisiológica entre o cérebro e a circulação sistémica, que protege o cérebro de possíveis agressões e flutuações que possam ocorrer na composição e conteúdo do sangue circulante (Schinkel 1997, Lai, Kuo et al. 2005, Patrick T. Ronaldson 2007).

As células do SNC são particularmente sensíveis à lesão química e requerem então um ambiente extracelular altamente controlado e regulado. Foi demonstrado ao longo de um século de estudos que a troca de solutos entre o sangue e cérebro é restrita e é conhecido, há aproximadamente 40 anos, que o local de trocas é nos capilares endoteliais cerebrais (Dallas, Miller et al. 2006).

Inicialmente, esta barreira era considerada uma barreira endotelial passiva à difusão de solutos. No entanto, atualmente, é reconhecido que a BHE é uma barreira endotelial altamente ativa e dinâmica executando várias funções, tendo um papel importante na mediação e translação de sinais periféricos diretamente para o cérebro ou vice-versa (Begley and Brightman 2003, Fricker and Miller 2004, Anika Hartz 2010). Ao mesmo tempo, tem também uma função imunológica separando o sistema imune do SNC do sistema imune periférico prevenindo que células imunológicas e patogénios como vários vírus e bactérias entrem no cérebro, protegendo ao mesmo tempo o cérebro de xenobióticos (Anika Hartz 2010).

A unidade funcional da BHE para além das células endoteliais capilares, inclui outros tipos de células que se encontram em constante e íntimo contacto com o endotélio e o desenvolvimento e manutenção do fenótipo dos capilares cerebrais (endotélio não fenestrado com junções estreitas características e alta expressão dos transportadores de

xenobiótico) parece ser muito dependente das interações com outras células que se encontram associadas aos capilares cerebrais, como os pericitos e os astrócitos (Dallas, Miller et al. 2006).

Dois elementos são tradicionalmente considerados responsáveis pela função de barreira do endotélio capilar cerebral: as junções estreitas (endotélio não fenestrado) que formam uma fechadura à difusão paracelular e as próprias células que exibem uma taxa baixa de endocitose (Dallas, Miller et al. 2006).

Estruturalmente a BHE é composta por uma monocamada de células endoteliais com raras fenestrações seladas por junções estreitas, circundada por pericitos e astrócitos perivasculares, formando um endotélio contínuo que serve de barreira entre o SNC e a corrente sanguínea, sendo impermeável a todas as moléculas lipídicas com o objetivo de defender o sistema nervoso de agentes tóxicos (Fricker and Miller 2004, Leslie, Deeley et al. 2005, Patrick T. Ronaldson 2007). Por estas razões a BHE fornece uma homeostase iônica e os nutrientes necessários para o funcionamento correto do SNC e protegendo-o de xenobióticos e regulando o nível de mediadores neuroativos. As células endoteliais capilares têm uma interação dinâmica com outras células vizinhas como a astroglia, pericitos, microglia perivascular e neurónios. Esta cooperação contribui para que estas células apresentem características únicas apresentando tanto características de células endoteliais como de células epiteliais (Nakagawa, Deli et al. 2009).

A função de barreira do endotélio capilar cerebral é baseada em três componentes: junções estreitas, enzimas metabólicas e transportadores seletivos (Anika Hartz 2010).

A rede complexa de junções estreitas é formada entre células endoteliais adjacentes para restringir a difusão paracelular de solutos do sangue para o cérebro.

As junções estreitas que mantêm as células endoteliais unidas são mantidas por fatores tróficos libertados por astrócitos adjacentes (Janzer and Raff 1987, Abbott 2002, Patrick T. Ronaldson 2007). Sobre condições fisiológicas estas junções estreitas formam uma barreira contínua e quase impenetrável que limita o fluxo paracelular e o transporte assim como o influxo de substâncias endógenas e exógenas, com a exceção de moléculas lipídicas solúveis muito pequenas (Reese and Karnovsky 1967, Patrick T. Ronaldson 2007).

A desagregação das junções estreitas é característica de muitas patologias a nível do SNC incluindo esclerose múltipla, doença de Alzheimer e acidentes vascular cerebral (Li and Ehrich 2013).

As enzimas metabolizadoras, componente bioquímico da função de barreira, são consideradas a segunda linha de defesa porque inativam os xenobióticos que entram nas células endoteliais dos capilares cerebrais (Anika Hartz 2010).

4.1 Barreira sangue – fluido cerebrospinal

A BCSF está localizada na superfície epitelial externa do plexo coroide, estrutura altamente vascularizada que se projeta nos quatros ventrículos cerebrais e que formam a principal interface entre o CSF e o sangue (Segal 2000, Dallas, Miller et al. 2006, Patrick T. Ronaldson 2007). O epitélio do plexo coroide é composto por capilares fenestrados, revestido por uma monocamada de células epiteliais unidas por junções estreitas (**figura 9**) (Gherzi-Egea and Strazielle 2001, Patrick T. Ronaldson 2007). Assim como na BHE, as junções estreitas entre as células epiteliais restringem o movimento através da via paracelular apesar destas não se encontrarem tão concentradas/agregadas como as dos capilares cerebrais. Estas junções estreitas formam a estrutura base da BCSF e selam as células epiteliais polarizadas. Assim, quando um soluto atravessa a parede capilar deve também atravessar esta parede de células epiteliais polarizada antes de entrar no SNC (Patrick T. Ronaldson 2007).

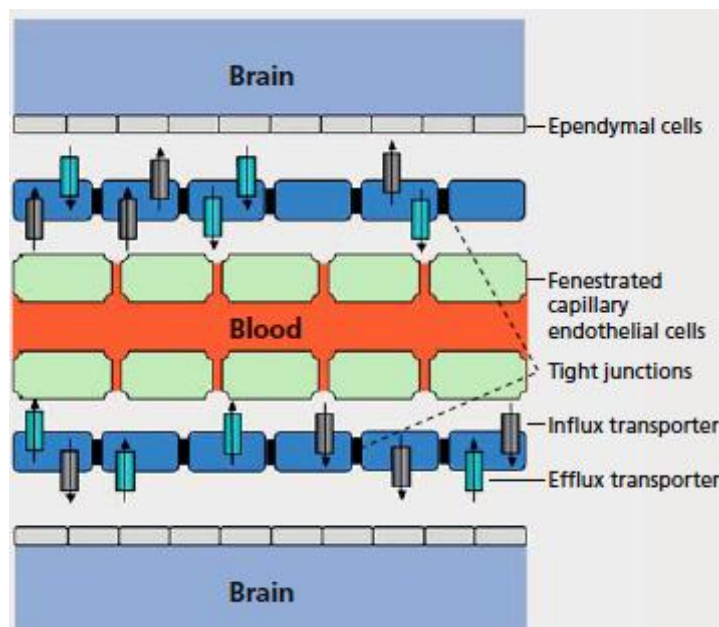


Figura 9 – Barreira cerebrospinal e transportadores presentes no plexo coroide. Adaptado de (Girardin 2006).

O CSF, secretado pelos plexos coróides para os ventrículos, tem outras funções como o fornecimento de nutrientes, regulação da osmolaridade, fornecimento de péptidos neuroativos e remoção de desperdícios metabólicos (Segal 2000, Strazielle, Khuth et al. 2004, Dallas, Miller et al. 2006).

A composição do CSF é rigorosamente mantida e, assim sendo, a entrada e saída de compostos para o CSF é estritamente regulada (Dallas, Miller et al. 2006). Dado a sua importância na manutenção da homeostasia do CSF não é de surpreender que uma variedade de proteínas de transporte esteja presente no epitélio do plexo coróide incluindo canais iônicos, transportadores de não eletrólitos, nutrientes e neurotransmissores (Lee, Dallas et al. 2001, Graff and Pollack 2004, Dallas, Miller et al. 2006).

Semelhante à BHE, o plexo coróide expressa vários recetores, canais iônicos, e sistemas de transporte que regulam a composição do CSF através da secreção e reabsorção (Azzi, Bernaudin et al. 1990, Patrick T. Ronaldson 2007). A membrana apical do plexo coróide expressa a bomba Na^+/K^+ -ATPásica, vários canais de aniões e catiões monovalentes (Lee, Dallas et al. 2001, Patrick T. Ronaldson 2007). Estudos demonstraram também a expressão de transportadores facilitados e de transportadores de canais de sódio para o transporte de não eletrólitos (Garner and Brown 1992, Patrick T. Ronaldson 2007).

O lado basolateral possui antiportes Na^+/H^+ , $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, transportadores para não eletrólitos e anidrase carbónica (Johanson, Sweeney et al. 1990, Patrick T. Ronaldson 2007).

Os plexos coróides expressam também vários transportadores de fármacos. A expressão da P-gp no plexo coróide foi confirmada, mas este transportador foi localizado principalmente em compartimentos intracelulares (Dallas, Miller et al. 2006). Uma grande variedade de transportadores pertencentes à superfamília de transportadores está também expressa na membrana apical e basolateral do epitélio do plexo coróide incluindo, OATPs, OATs e outras famílias de transportadores (Dallas, Miller et al. 2006). Assim como a BHE, várias enzimas metabolizadoras de fármacos foram identificadas no plexo coróide incluindo a glutatona S-transferase, UDP-glucoroniltransferase e outras isoformas da CYP450 (Dallas, Miller et al. 2006). A atividade destas enzimas é alta e assim foi considerado que o plexo coróide é o principal local de metabolismo de xenobióticos no cérebro. Assim como na BHE a extensão da contribuição do metabolismo na BCSF ainda não está esclarecido (Dallas, Miller et al. 2006).

A nível do plexo coroide foi detetada a expressão do gene MRP1 no humano, rato e ratinho, tendo sido localizada através de estudos de imunoquímica na membrana basolateral de células do plexo coroide de ratos (Choudhuri, Cherrington et al. 2003, Dallas, Miller et al. 2006, Patrick T. Ronaldson 2007).

Através de uma atividade experimental na qual foi administrada um substrato de Mrp1 em ratos, sem a presença do gene Mrp1, ficou demonstrado um fluxo transepitelial basal para apical e também acumulação de composto na presença de um determinado inibidor (Rao, Dahlheimer et al. 1999, Dallas, Miller et al. 2006).

Outra atividade experimental, na qual se comparou um ratinho sem a presença dos genes Mrp1, Mdr1a, Mdr1b e outro sem a presença dos genes Mdr1a, Mdr1b, mostraram um aumento de cerca de 10 vezes na concentração de etaposide nos ratinhos sem os três genes quando comparado com os ratinhos sem os dois genes, demonstrando a presença de uma isoforma funcional da Mrp1 na parte basolateral, que leva ao efluxo de aniões orgânicos para o sangue (Dallas, Miller et al. 2006).

Após administração intracerebroventricular de *S-(2,4-dinitrophenyl)glutathione* e *3 H-estradiol-17-β-Dglucuronide* (DNP-GS e E217BG) foram comparados as concentrações em ratinhos normais com ratinhos sem o gene Mrp1. A eliminação de ambos os compostos do CSF realizou-se, sugerindo que transportadores de aniões orgânicos para além do Mrp1 medeiam o efluxo do CSF (Dallas, Miller et al. 2006). Os Mrp2, Mrp3 e Mrp6 não foram considerados pois a sua expressão nos roedores é insignificante (Lee, Dallas et al. 2001, Choudhuri, Cherrington et al. 2003, Dallas, Miller et al. 2006). Por outro lado, os níveis de Mrna do Mrp4 e do Mrp5 no plexo coroide são altos e ambas as isoformas mostram capacidade para transportar conjugados de aniões orgânicos (Lee, Dallas et al. 2001, Choudhuri, Cherrington et al. 2003, Dallas, Miller et al. 2006). Uma possível explicação para a falta de efeito nos ratinhos sem o Mrp1 é a compensação específica, que se caracteriza pela capacidade de uma isoforma de MRP compensar a ausência de outra. Este acontecimento foi reportado previamente no fígado e rim em humanos, ratinhos e ratos sem o gene MRP2/Mrp2, com o aumento da atividade do Mrp3 e Mrp 4 em compensação (Chu, Strauss et al. 2006, Dallas, Miller et al. 2006).

Apesar da expressão do MRP4 ser certa no plexo coroide a localização exata das proteínas ainda não se encontra estabelecida. Como o MRP4 foi localizado na parte apical das células endoteliais cerebrais humanas e nos túbulos proximais renais do homem, rato e ratinhos e na membrana basolateral de células túbulo-acinares, fica demonstrada a ideia que a polaridade da expressão do MRP4/Mrp4 é específico das células. A expressão do MRP4/Mrp4 na membrana apical e basolateral da BHE e do plexo coroide indica que um papel para este transportador é limitar o influxo de aniões

orgânicos do sangue e encaminhar aniões orgânicos do cérebro para o sangue respetivamente (Leggas, Adachi et al. 2004, Nies, Jedlitschky et al. 2004, Dallas, Miller et al. 2006).

4.2 Transportadores a nível da BHE

O tratamento farmacológico de patologias do SNC requer que os fármacos alcancem o cérebro em concentrações eficazes. Este objetivo terapêutico requer que os fármacos sejam capazes de atravessar as barreiras (BHE e BCSF) no cérebro com sucesso e no caso de algumas patologias que consigam também atravessar alguns compartimentos celulares do parênquima cerebral (astrócitos, microglia, oligodendrócitos, neurónios) (Lee and Bendayan 2004). Apesar de compostos pequenos, não iónicos, lipossolúveis conseguirem entrar no cérebro por difusão passiva, a permeabilidade do SNC para compostos grandes, hidrossolúveis, e/ou substâncias iónicas é menos provável de acontecer por este mecanismo (Patrick T. Ronaldson 2007).

Para muitos destes compostos, a captação para o cérebro e a extrusão do cérebro é realizada por proteínas de transporte de fármacos.

Os transportadores a nível da BHE podem ser divididos (**figura 10**):

1. Transportadores de influxo altamente específicos incluindo os da superfamília de transportadores que permitem a entrada de glucose, aminoácidos, iões e outros nutrientes para preencher as necessidades energéticas do cérebro;
2. ABC transporters - transportadores de efluxo que representam a primeira linha de defesa utilizando ativamente o ATP que protege o cérebro de xenobióticos, removendo os restos metabólicos incluindo tóxicos perigosos e um vasto número de fármacos terapêuticos, prevenindo a sua entrada no cérebro (Miller 2010).

Para além destes, na superfície externa da membrana basal a presença de astrócitos pensa-se que ajuda nas defesas, pondo-se em hipótese que a secreção de fatores de crescimento por astrócitos pode ajudar no estabelecimento e manutenção do fenótipo de células endoteliais cerebrais. Ao mesmo tempo os astrócitos têm a capacidade de induzir em outras células a formação de junções estreitas interendoteliais (Nakagawa, Deli et al. 2009).

Pelo facto de as células endoteliais se encontrarem muito unidas e interagirem com componentes celulares do SNC como os astrócitos e pericitos estas apresentam uma TEER extremamente alta (1500 a 2000 cm²) e a passagem de solutos através da via paracelular é altamente restrita e para além disso, os capilares cerebrais estão cobertos por uma membrana basal contínua que se pensa que ajuda na defesa, conferindo assim

um ótimo ambiente para a função neuronal (Butt, Jones et al. 1990, Nakagawa, Deli et al. 2009, Balbuena, Li et al. 2010).

Enquanto a difusão através do espaço paracelular é quase ínfimo devido às junções estreitas, a difusão passiva através das células endoteliais é suplementada por uma variedade de proteínas de transporte através das células, que regulam ativamente o transporte de nutrientes, fármacos, metabolitos para dentro e fora do cérebro (Nakagawa, Deli et al. 2009).

Vários recetores, canais iónicos, transportadores de influxo ou efluxo encontram-se expressos na BHE. Funcionalmente, os transportadores são semelhantes aos transportadores nos outros sistemas (*D-glucose Transporter*, sistemas de transporte L-aminoácido, Na⁺/K⁺ -ATPásica) apesar da capacidade e taxa de transporte poder variar substancialmente (Lee, Dallas et al. 2001, Patrick T. Ronaldson 2007). A nível do endotélio microvascular cerebral muitos destes transportadores de membrana estão distribuídos de forma assimétrica (Patrick T. Ronaldson 2007).

A biotransformação de compostos estranhos a partir do metabolismo de fase I e II pode resultar em metabolitos que podem ser removidos do cérebro por transportadores de efluxo como os MRPs. Assim sendo, enzimas metabólicas e transportadores ativos podem atuar em conjunto como uma barreira bioquímica para remover os compostos potencialmente prejudiciais do ambiente cerebral (Dallas, Miller et al. 2006). O significado farmacológico da barreira metabólica está ainda por determinar.

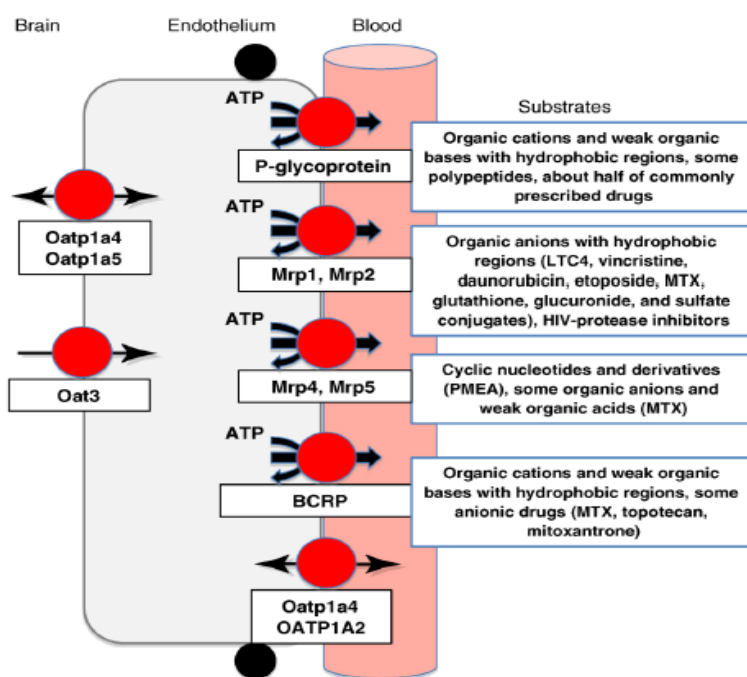


Figura 10 – Distribuição dos transportadores presentes na BHE. Adaptado de (Miller 2010).

4.2.1 Transportadores ABC

Apesar de todos os avanços na ciência e nas investigações a nível cerebral, as patologias que afetam o SNC continuam a ser muito difíceis de tratar pelo facto de, a maior parte dos fármacos, não conseguir atravessar a BHE (bloqueia cerca de 98% dos fármacos que atuam a nível do SNC) e também por não se conseguir perceber muito bem a patogénese destas doenças (Taylor 2002, Girardin 2006, Zhou 2008).

A penetração adequada na BHE é um pré-requisito para o design de compostos com ação a nível do SNC e, ao mesmo tempo, deve ser tomada em conta no desenvolvimento de fármacos cuja ação não seja ao nível do SNC. A P-gp e outros transportadores ABC podem limitar a penetração de compostos na BHE e assim modular a eficácia e a toxicidade a nível do SNC de vários fármacos (Begley 2004, Deeley, Westlake et al. 2006, Zhou 2008).

A BHE atua como uma barreira anatómica e de transporte notável devido à presença de junções estreitas e de transportadores ABC como a P-gp, BCRP, MRP1,2,3,4,5 e 6. Assim esta BHE contribuiu para a homeostasia cerebral protegendo o cérebro de substâncias endógenas e exógenas potencialmente perigosas (Zhou 2008). A maioria dos conhecimentos que temos do funcionamento da BHE vem do estudo da P-gp (Fricker and Miller 2004). No entanto, foi possível identificar, até agora vários transportadores ABC a nível da BHE, estando todos apresentados na tabela (**tabela 6**).

Tabela 6 – Substratos dos Transportadores ABC. Adaptado de (Löscher and Potschka 2005).

Transportadores ABC	Substratos
P-gp	Fármacos anticancerígenos Inibidores de protease VIH Citocinas Agentes Antidiarreicos Bloqueadores de Canais de cálcio Fármacos antiepiléticos Antidepressivos
MRP1 (ABCC1)	Fármacos anticancerígenos Leucotrienos Conjugados de glutathione Compostos não conjugados
MRP2 (ABCC2)	Semelhante ao MRP1
MRP3 (ABCC3)	Substratos semelhantes ao MRP1 e MRP2
MRP4 (ABCC4)	Fármacos anticancerígenos como metotrexato, 6-mercaptopurina, tioguanina
MRP5 (ABCC5)	cGMP, Camp, , 6-mercaptopurina, tioguanina, fluoresceína
MRP6 (ABCC6)	BQ-123
BCRP (ABCG2)	Fármacos anticancerígenos Antraciclinos Mitoxantrona

A importância da P-gp, BCRP e dos MRPs na BHE baseia-se em 4 características que estes transportadores partilham:

1. Expressão proteica substancial;
2. Localização na membrana apical das células endoteliais capilares na interface entre o SNC e o sangue, funcionando tanto como bomba de influxo e de efluxo de compostos;
3. Efluxo potente de compostos contra o gradiente de concentração através da utilização de ATP para realizar o transporte ativo, prevenindo a entrada de substratos para o citoplasma das células barreira;
4. Alto espectro de reconhecimento de compostos terapêuticos e xenobióticos, como a morfina, ciclosporina A entre outros (Fricker and Miller 2004, Miller 2010).

4.3 P-gp

Muitos transportadores de fármacos foram localizados nas células endoteliais dos capilares cerebrais e vários transportadores de efluxo estão posicionados de forma a ter um papel essencial na BHE. No entanto, é claro que a P-gp é um elemento importante nesta barreira, determinando a penetração de muitos compostos anfipáticos incluindo fármacos e xenobióticos protegendo o cérebro da ação de toxinas, mas também funcionando como obstáculo para a entrada de fármacos com mecanismo de ação sobre patologias a nível do SNC como a epilepsia, VIH, infeções no SNC e tumores cerebrais (Schinkel 1997, Fricker and Miller 2004, Leslie, Deeley et al. 2005, Miller, Bauer et al. 2008).

A nível de localização este transportador encontra-se em grandes concentrações a nível dos capilares cerebrais, mais propriamente na membrana apical das células endoteliais dos capilares cerebrais, sendo esta a localização ideal para limitar de forma eficiente a difusão de fármacos do sangue para o citoplasma das células endoteliais e assim para o parênquima cerebral (Miller, Bauer et al. 2008). A localização predominante na membrana apical dos capilares cerebrais foi verificada em múltiplos modelos com complexidade biológica, como membranas apicais isoladas, células endoteliais isoladas e culturas celulares primárias, capilares isolados, partes de tecido saudáveis e determinados tumores cerebrais (Jette, Tetu et al. 1993, Huwyler, Drewe et al. 1996, Beaulieu, Demeule et al. 1997, Miller, Nobmann et al. 2000, Fellner, Bauer et al. 2002, Fricker and Miller 2004).

A P-gp é também encontrada na membrana apical do plexo coroide sugerindo que medeia o transporte de compostos do sangue para o CSF, estando a influência toxicológica da expressão da P-gp no plexo coroide ainda por determinar (Leslie, Deeley et al. 2005). Este transportador está também presente a nível dos astrócitos e microglia e o seu efeito fisiológico mais evidente nesta camada é a proteção do cérebro (Fricker and Miller 2004, Leslie, Deeley et al. 2005).

Nos ratinhos foi detetada a expressão da P-gp nas células da microglia do rato (MLS-9), nos astrócitos do rato, nas células endoteliais dos microvasos e in situ nos capilares cerebrais dos ratos (Lee, Schlichter et al. 2001, Ronaldson, Bendayan et al. 2004, Patrick T. Ronaldson 2007). Mais recentemente, a expressão da P-gp está também reportada nas células da glioma. Foi demonstrado também que a P-gp está também expressa na caveolae (microdomínios da membrana plasmática que regulam vários processos celulares) das células endoteliais dos microvasos tanto humano como dos bovinos (Decleves, Fajac et al. 2002, Jodoin, Demeule et al. 2003, Patrick T. Ronaldson 2007).

A expressão da P-gp na BHE foi extensivamente estudada e descrita através de estudos em ratinhos sem Mdr1a e Mdr1b. A Mdr1a é a isoforma primária da P-gp detetada nos microvasos do cérebro enquanto a Mdr1b é a isoforma principal detetada no parênquima cerebral. Os ratinhos sem presença do Mdr1a são muito mais sensíveis à neurotoxicidade por compostos como vinblastina e ivermectina do que os ratinhos normais. A captação de ivermectina e vinblastina em ratinhos sem o gene Mdr1a é 26 e 11 vezes maior respetivamente do que em ratinhos normais (Leslie, Deeley et al. 2005). Foi também realizado um estudo no qual através do estudo da acumulação da ivermectina, ciclosporina A, digoxina e vinblastina descobriu-se uma acumulação destes compostos 1 a 2 vezes maior em ratinhos sem a presença de Mdr1a quando comparado com ratinhos normais (Schinkel, Smit et al. 1994, Schinkel, Wagenaar et al. 1995, Schinkel 1997).

Um outro exemplo da importância da P-gp na BHE é o loperamido, que é um opiáceo que tem uma ação predominantemente periférica no intestino, levando a uma diminuição da motilidade do intestino sendo assim essencial para tratamento de diarreias. Normalmente o loperamido não tem atividade a nível do SNC visto que o fármaco não entra no cérebro. No entanto, em ratinhos sem a presença de mdr1a este fármaco é altamente penetrante no cérebro provocando alterações de comportamento indicativas da atividade do opiáceo no SNC (Schinkel 1997).

Dado que muitos compostos são substratos da P-gp (ciclosporina A, ivermectina, DOX, vinblastina) pode afirmar-se que P-gp na BHE é a maior causadora da baixa acumulação de compostos anfipáticos hidrofóbicos no cérebro. Aparentemente, este transportador, realiza o transporte de compostos que entram nas células endoteliais por difusão passiva de novo para a corrente sanguínea (Schinkel 1997).

4.4 MRP

Tendo em conta a capacidade de transporte, localização e a expressão no SNC, é sugerido que as isoformas de MRP/Mrp têm um papel crítico em regular a acumulação e distribuição de compostos terapêuticos. Várias linhas celulares indicam que as isoformas do MRP estão expressas em pelo menos um compartimento do SNC e que provavelmente têm um papel importante no transporte de fármacos e metabolitos (Patrick T. Ronaldson 2007).

Deve ser tomado em conta que ao longo da última década estudos examinando a expressão de MRPs no cérebro produziram resultados contraditórios e controversos e para muitas isoformas do MRP havendo ainda muita discussão sobre um dos seguintes pontos:

- Níveis de expressão do transportador;
- Localização subcelular da proteína;
- Envolvimento no transporte de compostos específicos;
- Cinética funcional (Fricker and Miller 2004, Dallas, Miller et al. 2006, Patrick T. Ronaldson 2007);

À primeira vista os dois primeiros fatores parecem ser dependentes da célula e os restantes dependentes do transportador. No entanto interações ao nível molecular com os lípidos, proteínas e pequenas moléculas de sinalização podem influenciar a especificidade e cinética do transportador, sendo estes também em parte dependentes das células (Dallas, Miller et al. 2006).

A falta de dados consistentes pode refletir diferenças entre espécies em relação à especificidade de substratos, metabolismo e/ou expressão de transportadores e diferenças substanciais nos níveis de expressão entre os capilares cerebrais em sistemas *in vitro* e *in situ*, como por exemplo, capilares cerebrais isolados, células endoteliais em culturas primárias e linhas celulares endoteliais (Dallas, Miller et al. 2006).

Através da RT-PCR um grupo de investigadores identificou a presença de mRNA Mrp1 em culturas de células endoteliais de microvasos cerebrais de bovinos. Mais recentemente através da técnica de microscopia de varrimento confocal foi possível

localizar este transportador na parte luminal da BHE humana (Zhang, Han et al. 2000, Patrick T. Ronaldson 2007).

Nos mamíferos há também provas que a expressão da Mrp2 (em ratos mas não em vacas e humanos), MRP4/Mrp4 (homens, vacas e ratos), Mrp5 (vaca e rato) e Mrp6 (vacas) (Zhang, Han et al. 2000, Nies, Jedlitschky et al. 2004, Patrick T. Ronaldson 2007).

A presença de várias isoformas de MRP na BHE pode ser importante para controlar o uptake de aniões orgânicos para o cérebro (Patrick T. Ronaldson 2007). A MRP2 foi encontrada na membrana apical do endotélio capilar cerebral em peixes, ratos, porcos e humanos sugerindo um possível papel para este transportador em reduzir a entrada de certos xenobióticos do sangue para o cérebro. A função da MRP2 em outras áreas do cérebro não é tão bem conhecida. Os baixos níveis do mRNA do Mrp2 encontrados no plexo coroide de ratos sugerem que a sua função mais importante no cérebro é a nível dos capilares na BHE (Leslie, Deeley et al. 2005).

Apesar do Mrp6 não ter sido detetado em astrócitos, microglia e oligodendrócitos, um estudo recente sugeriu que os neurónios humanos expressam em grande quantidade MRP6 (Beck, Hayashi et al. 2005, Patrick T. Ronaldson 2007). Também foi demonstrado que o MRP8 encontra-se co-localizado nos microfilamentos da matéria branca do cérebro, sugerindo que é principalmente uma proteína axonal (Bortfeld, Rius et al. 2006, Patrick T. Ronaldson 2007).

No parênquima cerebral a expressão mRNA do MRP/Mrp está reportada nos astrócitos, microglia, oligodendrócitos e neurónios. A expressão de MRP1/Mrp1, MRP3/Mrp3, MRP4/Mrp4 e MRP5/Mrp5 está reportada em todos estes tipos de células (Patrick T. Ronaldson 2007). Apesar de vários estudos reportarem que as células do parênquima cerebral expressam níveis reduzidos de MRP2/Mrp2, investigadores detetaram a expressão de mRNA de Mrp2 em astrócitos isolados de ratos embrionários. (Patrick T. Ronaldson 2007). Estas diferenças de expressão podem ser explicadas pelas diferenças na expressão pré natal e pós natal de Mrp2 (Patrick T. Ronaldson 2007).

A avaliação funcional dos MRPs é normalmente confundida com a sobreposição de especificidade e expressão similar nos tecidos entre os membros da família MRP e membros de outras famílias como a família de transportadores de aniões orgânicos e Polipéptidos transportadores de aniões orgânicos. Para além disso há falta de inibidores e substratos que sejam específicos para determinados MRPs (Dallas, Miller et al. 2006). Assim sendo apesar de poder ser determinada a localização e a expressão de um MRP num tecido e numa região da membrana plasmática a contribuição que esse

transportador tem no transporte de um substrato específico pode ser difícil de determinar (Dallas, Miller et al. 2006).

Apesar de todas as dificuldades um grande número de provas demonstra que todas as isoformas de MRP estão expressas em pelo menos um compartimento do SNC e que provavelmente têm um papel no transporte de fármacos e metabolitos (Dallas, Miller et al. 2006). No entanto, não é de surpreender que haja muita controvérsia em relação à localização e função de determinados membros da família.

4.4.1 MRP1

A MRP1 é conhecida por transportar inibidores da protease do VIH tendo sido postulado que pode ter um papel na baixa penetração destes e de outros compostos terapêuticos, assim como em toxinas (Leslie, Deeley et al. 2005).

O papel fisiológico do MRP1 nos capilares da BHE não está até agora muito bem definido. Foi demonstrado que está presente na parte apical das células endoteliais dos microvasos e nos capilares cerebrais. Assim sendo, a localização nestas células difere da sua típica localização basolateral na maior parte dos outros tecidos, incluindo outros tecidos cerebrais, e células epiteliais polarizadas, sugerindo que a MRP1 pode contribuir para a redução da entrada de aniões orgânicos para o cérebro (Leslie, Deeley et al. 2005).

Prevê-se que a MRP1 tenha uma função importante na proteção da microglia dos efeitos tóxicos de substratos endógenos, como a bilirrubina não conjugada que mesmo em concentrações pouco elevadas é potencialmente tóxica para os astrócitos e neurónios (Leslie, Deeley et al. 2005).

A MRP1 está também implicada em proteger o cérebro contra xenobióticos, estando localizada na membrana basolateral das células epiteliais da coróide prevenindo a penetração de fármacos e toxinas no CSF (Zhou 2008).

Ficou demonstrado através de biópsias ao cérebro humano e a culturas da microglia de ratinhos que a MRP1 é expressa e parece ser funcional no cérebro das células gliais in vivo (Leslie, Deeley et al. 2005).

Assim como a MRP1, também a MRP4 foi recentemente localizada na superfície basolateral do plexo coróide e no lado apical das células endoteliais dos microvasos cerebrais. Para além disso, ratinhos sem a presença deste transportador no CSF e no tecido cerebral aumentaram a acumulação de topotecan, sugerindo que a MRP4 tem uma importante função na proteção do tecido cerebral destes e outros potenciais xenobióticos (Leslie, Deeley et al. 2005).

4.5 BCRP (ABCG2)

A BCRP tem um papel fundamental na quimioterapia, visto que muitos fármacos são substratos desta bomba de efluxo. Ao mesmo tempo este transportador tem um papel significativo na sobreposição de substratos específicos da P-gp reconhecendo uma vasta gama de aniões orgânicos sulfoconjugados e compostos hidrofóbicos (Patrick T. Ronaldson 2007).

Um exemplo da importância deste transportador é o topotecan que é um substrato conhecido deste transportador, limitando a penetração deste composto no cérebro (Mahringer, Ott et al. 2011). O imatinib mesilato, composto indicado para o tratamento de tumores gastrointestinais é outro substrato deste transportador. Estudos *in vitro* em ratinhos sem a presença do BCRP, mostra que este composto penetra no SNC 2 a 5 vezes mais do que em ratinhos normais (Mahringer, Ott et al. 2011).

A localização deste transportador a nível da BHE e dos compartimentos cerebrais ainda é muito controversa e há também estudos que defendem a ausência completa deste transportador a nível cerebral.

Estudos em culturas primárias de células endoteliais cerebrais e na linha celular RBE4 mostraram que acumulação de mitoxantrona, um substrato da ABCG2, não aumentou na presença de inibidores standard de ABCG2, sugerindo que estas linhas celulares não expressam este transportador (Patrick T. Ronaldson 2007). O mesmo estudo permitiu verificar também a ausência de efluxo de mitoxantrona em culturas primárias de astrócitos de ratinhos e na linha celular MLS-9.

Outros estudos indicam que, assim como a P-gp também a BCRP está expressa de forma predominante na superfície apical dos capilares cerebrais. Foi detetado que os níveis de BCRP em ratinhos sem a presença do *mdr1a* são superiores quando comparado com os níveis em ratinhos normais, sugerindo que à uma ação compensatória deste transportador na ausência do *mdr1a* (Leslie, Deeley et al. 2005).

Vários estudos demonstram que a expressão da ABCG2 no cérebro ocorre particularmente ao longo da membrana apical da BHE (Patrick T. Ronaldson 2007). Um estudo demonstrou que a ABCG2 encontra-se em ambas as culturas primárias das células endoteliais cerebrais humanas dos microvasos (Patrick T. Ronaldson 2007).

Nos ratinhos este transportador foi detetado na parte apical dos capilares cerebrais, o que pode indicar que este transportador tem um papel essencial na limitação da captação de vários xenobióticos (Lee, Kusuvara et al. 2005, Patrick T. Ronaldson 2007). A baixa expressão de ABCG2 no parênquima foi demonstrada nas culturas primárias de astrócitos de rato e na microglia, assim como na linha celular MLS-9 e nos astrócitos do feto humano (Patrick T. Ronaldson 2007).

Dados de estudos *in vivo* recentes em ratinhos sem a presença de BCRP são controversos, indicando alguns estudos que este transportador não é funcional na BHE, enquanto outros sugerem que a BCRP é ativa na BHE. Mais estudos são assim necessários para clarificar a função deste transportador na BHE (Patrick T. Ronaldson 2007).

4.6 Outros transportadores na BHE

No SNC para além dos transportadores ABC, tais como a P-gp, MRP e BCRP destaca-se a presença de outros transportadores como os da superfamília SLC:

Isoformas OATP Humanas – Estudos prévios mostram que há expressão das isoformas de OATP em tecidos cerebrais humanos. A partir da imunofluorescência no tecido do córtex frontal do cérebro humano ficou demonstrado que o OATP-A está presente ao longo da membrana das células endoteliais dos capilares cerebrais e das células endoteliais dos microvasos (Patrick T. Ronaldson 2007). Pelo contrário este transportador não foi detetado nos neurónios nem nos astrócitos (Patrick T. Ronaldson 2007). Outros OATPs que foram detetados no cérebro humano são o OATP-B, OATP-D, OATP-E e OATP-F (Patrick T. Ronaldson 2007);

Família de transportadores de Aníões Orgânicos – A expressão deste transportador no plexo coroide e na BHE e pelo facto de as hormonas esteroides, neurotransmissores e os seus metabolitos serem seus substratos sugerem que estes transportadores regulam a composição do cérebro controlando o fluxo de xenobióticos do CSF e do líquido cefalorraquidiano. A nível cerebral estão presentes o OAT-1, OAT-3 e OAT-4, que se encontram expressos principalmente no plexo coroide e nas células endoteliais da microvasculatura cerebral (Mori, Takanaga et al. 2003, Patrick T. Ronaldson 2007);

Família de transportadores de Catiões Orgânicos – Os transportadores desta família de transporte encontram-se dispersos ao longo do cérebro podendo desempenhar diversas funções.

O OCT1 encontra-se presente em pouca concentração no cérebro a nível do plexo coroide e astrócitos. O OCT2 está presente nos neurónios (células piramidais do hipocampo humano, córtex cerebral, e núcleo subcortical) e no plexo coroide dos ratos (Patrick T. Ronaldson 2007). Foi reportado que este transportador medeia o transporte de substratos endógenos (dopamina, norepinefrina, serotonina entre outros) e substratos exógenos (Busch, Karbach et al. 1998, Patrick T. Ronaldson 2007). Assim sendo o OCT2 no SNC pode estar envolvido na captação de colina para os neurónios e na reabsorção de colina a partir do CSF. Por outras palavras o OCT2 pode ajudar na redução da

concentração de neurotransmissores e dos seus metabolitos e proteger o cérebro de excitotoxicidade dos neurotransmissores (Patrick T. Ronaldson 2007).

O OCT3 encontra-se expresso em pouca concentração no cérebro, sendo mesmo assim mais expresso que o OCT-1, encontrando-se principalmente expresso no córtex cerebral e cerebello e neurónios do hipocampo dos roedores (Kekuda, Prasad et al. 1998, Patrick T. Ronaldson 2007)

A expressão do OCT3 em combinação com a sua capacidade de interagir com as neurotoxinas catiónicas e neurotransmissores sugere que este transportador pode ter um papel importante no manuseamento de compostos neuroativos no cérebro, devido à sua localização nos astrócitos corticais e à sua capacidade para mediar o influxo de catecolaminas e cations orgânicos neurotóxicos (Grundemann, Schechinger et al. 1998, Kekuda, Prasad et al. 1998, Patrick T. Ronaldson 2007). No entanto, o papel essencial do OCT3 no cérebro ainda não está completamente definido.

Para além destes transportadores estão também presentes a nível cerebral transportadores da família dos transportadores peptídicos, nucleosídeos equilibrativos e nucleosídeos concentrativos (Patrick T. Ronaldson 2007).

5. Linhas Celulares *in Vitro*

5.1 Linha celular Caco-2

A linha celular Caco-2 desenvolvida pelo Instituto para Investigação do Cancro Sloan-Kettering é constituída por células heterogéneas humanas epiteliais do adenocarcinoma. Esta linha foi o resultado de uma investigação realizada por Dr. Jorgen Fogh e simula, de forma quase perfeita, os enterócitos do intestino delgado expressando vários transportadores envolvidos na absorção e excreção de fármacos, incluindo a P-gp (Fogh 1975, Silva, Carmo et al. 2013). Esta linha celular é muito utilizada na indústria farmacêutica como modelo *in vitro* das células da mucosa do intestino delgado, para prever a absorção de compostos administrados oralmente (Silva, Carmo et al. 2013). A versatilidade das células Caco-2 está demonstrada pelo facto de, até à data, servirem como base para a criação de modelos inovadores que contribuem para se entender o efluxo de compostos por vários transportadores entre eles a P-gp e a BCRP. O nível de expressão da P-gp nas células Caco-2 está em grande concordância com os níveis de expressão nos enterócitos do jejuno humano tendo sido descrito que este transportador localiza-se na membrana apical desta linha celular intestinal (Silva, Carmo et al. 2013).

Estas células Caco-2 expressam a P-gp e outros transportadores ABC em concentrações semelhantes ao das células intestinais com exceção do transportador BCRP (Silva, Carmo et al. 2011).

Apesar desta linha celular derivar do carcinoma do cólon/jejuno (intestino grosso), quando cultivadas sobre condições específicas, as células diferenciam-se formando uma monocamada de células epiteliais polarizadas de tal modo que o seu fenótipo, morfológico e funcional, se assemelha com os enterócitos que revestem o intestino delgado, proporcionando uma barreira física e bioquímica à passagem de iões e de pequenas moléculas (Moise Pinto 1983, Hidalgo, Raub et al. 1989, Artursson 1990).

As células Caco-2 reconstituem uma morfologia cilíndrica polarizada apresentando microvilosidades no lado apical, junções estreitas entre células adjacentes, atividade enzimática das hidrolases e um número de enzimas e transportadores que são características dos enterócitos, como por exemplo as peptidases, esterases, P-gp, sucrase-isomaltase, lactase, aminopeptidase-N, dipeptidilpeptidase IV (Sambuy, De Angelis et al. 2005). Apesar da expressão destas enzimas ser observada no cólon humano por volta das 15 semanas de gestação não estão presentes no cólon de indivíduos adultos (Sambuy, De Angelis et al. 2005). Ao mesmo tempo, possuem capacidade absorptiva de sais biliares, cobalamina, glucose e dipéptidos, características comuns do intestino humano (Hunter, Jepson et al. 1993).

Entre outras características que são expressas nas células Caco-2 encontram-se os recetores de membrana polarizada para fatores de crescimento e várias atividades de transporte em ambas as membranas. Para melhor reproduzir as condições intestinais, as células Caco-2 são cultivadas em filtros permeáveis que permitem o acesso livre de iões e nutrientes aos dois lados da monocamada (Sambuy, De Angelis et al. 2005).

Estas células Caco-2 oferecem vantagens consideráveis comparando com as amostras *in vivo* ou *in vitro* do intestino, para o estudo das propriedades funcionais do processo de transporte, incluindo aquelas mediadas pela P-gp. As vantagens das células Caco-2 em relação a outros modelos reside no facto de serem constituídas por uma só camada epitelial, sem camada mucosa adjacente e sem tecidos musculares, impedindo assim que se liguem a solutos ou bloqueiem o acesso a superfícies membranares. Outra vantagem reside no facto de serem células de fácil manuseamento, com pouco risco associado de deterioração e facilidade de manutenção da viabilidade tecidual (Hunter, Jepson et al. 1993).

As células Caco-2 são normalmente utilizadas como uma monocamada confluenta (*Transwell*).

5.2 Linha celular RBE4

Modelos *in vitro* da BHE foram desenvolvidos a partir de culturas de bovinos, porcos, roedores, ou células endoteliais humanas dos microvasos cerebrais com roedores ou astrócitos humanos (Cecchelli, Dehouck et al. 1999, Gaillard, Voorwinden et al. 2001, Roux and Couraud 2005).

No entanto, estes modelos têm apresentado vários inconvenientes que limitam o uso destes modelos em investigação assim como em processos de screening de fármacos:

1. O uso destes modelos obriga ao dispêndio de muito tempo sendo ao mesmo tempo modelos muito caros;
2. As células endoteliais humanas dos microvasos cerebrais rapidamente se diferenciam *in vitro*, perdendo as características das células endoteliais da BHE após algumas passagens em cultura, limitando assim o seu uso para estudos bioquímicos e farmacológicos;
3. Em culturas primárias é difícil eliminar todas as células não endoteliais contaminantes (pericitos, células de musculo liso) (Roux and Couraud 2005).

Estas células contaminantes ocupam espaço na monocamada, provocando muitas vezes o aparecimento de espaços vazios, pois as células endoteliais parecem ser incapazes de crescer sobre eles. Torna-se assim, uma limitação para estudos de permeabilidade transendotelial e transporte (Roux and Couraud 2005).

Como a maioria dos estudos são realizados em pequenos animais de laboratório, especialmente ratos, é importante estabelecer um sistema de cultura de células endoteliais do cérebro do rato (RBE) que permita a correlação entre os resultados *in vitro* e os resultados *in vivo* (Roux and Couraud 2005)

De modo a anular todos inconvenientes anteriormente referidos foram realizados vários estudos laboratoriais de modo a estabelecer uma linha celular de RBE que retenha um fenótipo estável em culturas que se assemelhe ao endotélio da BHE *in vivo* (Roux and Couraud 2005).

A primeira linha celular RBE a ser descrita foi a RBE4 por Roux em 1994 (Roux et al 1994), existindo mais linhas celulares de RBE que se encontram listadas na tabela (**tabela 7**) (Roux and Couraud 2005).

Tabela 7 – Linhas celulares imortalizadas de células endoteliais de capilares cerebrais de ratinhos. Adaptado de (Roux and Couraud 2005).

Linha celular	Gene imortalizado
RBE4	Adenovírus E1A
GP8/3.9	Antigénio – T SV40
GPNT	Antigénio – T SV40
RBEC1	Antigénio – T SV40
TR-BBBs	Antigénio – T SV40
Rbce4	Polyoma vírus large Antigen – T

Estas linhas celulares imortalizadas foram selecionadas baseadas numa série de critérios fenotípicos:

- Exibição de fenótipo não transformado;
- Expressão de certos marcadores de células endoteliais;
- Expressão de determinadas propriedades específicas da BHE (Couraud, Greenwood et al. 2003).

A maioria destas linhas celulares da RBE foi imortalizada por transfecção. A linha celular RBE4 foi imortalizada por transfecção com o pE1A/neo plasmídeo usando o procedimento de coprecipitação de fosfato de cálcio, que basicamente consiste na ligação do plasmídeo ADN ao precipitado de fosfato de cálcio insolúvel que adere à superfície celular e o complexo entra depois na célula por endocitose (Grosjean, Bertschinger et al. 2006). Apesar desta técnica ser pouco eficaz é relativamente simples quando comparado com outros métodos de transfecção. O plasmídeo usado neste procedimento contém a região E1A do adenovírus 2 e o gene de resistência à neomicina

Como mencionado anteriormente as células RBE4 têm de ir ao encontro de alguns critérios de modo a ser considerado um modelo imortalizado *in vitro* da BHE.

Um dos parâmetros que a linha celular precisa de cumprir é a expressão de propriedades específicas da BHE que inclui junções estreitas, diferenciação citoesqueleto e estreitamento da monocamada, atividade enzimática da GGT e ALP e atividade dos transportadores membranares, incluindo a P-gp (Roux and Couraud 2005).

Esta linha celular é importante salientar que tem algumas discrepâncias quando comparado com a função *in situ* da BHE como baixos níveis de atividade enzimática ou de transportadores e alta permeabilidade paracelular, que deve ser tido em conta na realização de estudos usando este modelo (Roux and Couraud 2005).

A linha celular RBE4 tem sido utilizada para:

- Demonstrar que a Molécula Intracelular de Adesão 1 (ICAM-1) no endotélio celular ativa várias vias de transdução de sinal;
- Estudo das características de sinalização das células endoteliais cerebrais;
- Regulação da P-gp;
- Migração celular;
- Estudos de permeabilidade (Krizbai, Szabo et al. 1995, Smith and Drewes 2006, Barakat, Turcotte et al. 2008)

6. Xantonas e Tioxantonas

Como referido anteriormente, a P-gp tem um papel importante no efluxo de determinados compostos, de modo defender o organismo contra os xenobióticos. Assim sendo, a indução da expressão e/ou atividade deste e de outros transportadores pode evitar a acumulação intracelular e posterior toxicidade de determinados compostos.

O grupo químico das xantonas (Xs) e das tioxantonas (TXs) inclui compostos que têm sido sintetizados e testados como possíveis moduladores da expressão e atividade da P-gp. Na realidade as Xs e TXs pertencem a uma família de compostos com grande interesse na química. Tal interesse advém dos seus efeitos biológicos, que associados aos poucos efeitos secundários recorrentes do seu uso, resulta numa interação com um intervalo de segurança ideal para uso terapêutico. (Masters and Brase 2012)

As Xs, composto químico dibenzo-y-pireno, são uma família de compostos com grande atividade biológica encontrando-se na natureza mais de mil derivados naturais deste composto (Mengwasser 2011). As Xs são metabolitos secundários de plantas que foram isolados a partir de família de plantas maiores, fungos ou líquens (Zhao and Larock 2007, Mengwasser 2011).

A nível de isolamento todas as partes da planta contêm Xs, que podem ser extraídas com solventes orgânicos e posteriormente separadas por cromatografia em gel de sílica ou por HPLC (Mengwasser 2011).

As Xs podem ser classificadas em seis grupos principais

1. Xs hidroxixantonas;
2. Xs glicosiladas;
3. Xs preniladas;
4. Xs lignóides;
5. Bis-Xs;
6. Xs miscelâneas (Mengwasser 2011).

Estes seis grupos principais estão depois subdivididos de acordo com o grau de oxigenação, podendo ser Xs não oxigenadas, mono-, di-,tri-,tetra-,penta- e hexaoxigenadas (Mengwasser 2011).

As Xs exibem propriedades farmacêuticas interessantes, nomeadamente antibacterianas, anti-inflamatórias, anti-cancerígenas e anti-virais (Zhao and Larock 2007). Têm grande atividade biológica e grande espectro em múltiplas doenças, resultante da interação com uma diversidade de biomoléculas alvo, sendo mesmo designados estes compostos de “estruturas privilegiadas” (Silva, Sousa et al. 2014).

Algumas Xs prenildas mostram afinidade para se ligar ao domínio recombinante da P-gp e, mais recentemente, as Xs oxigenadas foram identificadas como seletiva da itotoxicidade das células cancerígenas que sobre expressam o transportador ABC, MRP1 (Tchamo, Dijoux-Franca et al. 2000, Sousa, Palmeira et al. 2013, Silva, Sousa et al. 2014).

Um estudo avaliou atividade inibitória de 4 derivados xantónicos, duas dihidroxixantonas, uma xantolignóide e uma piroxantona, na linha celular (k562DOX) que é uma linha celular que sobreexpressa P-gp, de modo a verificar atividade e a capacidade inibidora de crescimento de células tumorais. Assim foi realizado um ensaio de acumulação de rodamina (Rh123) nesta linha celular juntamente com os quatro derivados xantónicos e o VER (inibidor da P-gp) de modo avaliar a atividade inibitória destes compostos (Sousa, Palmeira et al. 2013).

Os resultados deste estudo mostraram que para além do VER, dois dos compostos (xantolignóide e xantona prenildada) aumentam a acumulação de RH123 na linha celular, atuando assim como inibidores da P-gp, comportando-se como inibidores não competitivos da P-gp, bloqueando a atividade da ATPásica. Já os outros dois compostos mostraram um comportamento idêntico aos ativadores da P-gp aumentando a concentração intracelular de Rh123 (Sousa, Palmeira et al. 2013). Assim sendo, podemos afirmar que a xantolignóide e xantona prenildada mostram ter efeito inibitório no crescimento da linha celular tumoral humana.

Noutro estudo, foi investigado o potencial de cinco Xs dihidroxiladas como indutores da expressão e/ou da atividade da P-gp e a capacidade destes compostos em proteger as células Caco-2 contra a citotoxicidade induzida pelo PQ, substrato da P-gp (Dinis-Oliveira, Duarte et al. 2006, Dinis-Oliveira, Remiao et al. 2006, Silva, Sousa et al. 2014). Após uma incubação de 24 horas todas as Xs testadas causaram um aumento significativo da expressão e atividade da P-gp e mesmo quando incubadas 45 minutos apenas, mostraram ter capacidade de induzir atividade da P-gp, indicando que ativam a

bomba de efluxo sem aumentarem a expressão deste mesmo transportador (Silva, Sousa et al. 2014).

Já as TXs constituem uma classe de moléculas com propriedades biológicas semelhantes às Xs, demonstrando também atividade anti-tumoral e capacidade de modulação da P-gp (Silva, Palmeira et al. 2015). De facto, estudos prévios evidenciaram a capacidade de TXs aminadas atuarem como inibidoras da P-gp com melhoria da eficácia na sensibilização de uma linha celular que é resistente à DOX e que sobreexpressa a P-gp (K562DOX) (Palmeira, Vasconcelos et al. 2012). Neste estudo algumas das TXs estudadas causaram um decréscimo significativo da acumulação de rodamina 123 (RHO 123), efeito compatível com uma possível ativação da P-gp (Palmeira, Vasconcelos et al. 2012).

Têm sido sintetizados e testados alguns derivados de Xs e TXs com o propósito de encontrar um composto com habilidade para aumentar atividade e/ou expressão da P-gp como via de destoxificação. Um estudo realizado por Silva et al. permitiu testar vários derivados de TXs dihidroxilados (TXs 1 - 5) para avaliar a sua eficácia no aumento da atividade e expressão da P-gp e ao mesmo tempo a sua capacidade de proteção das células caco-2 contra a toxicidade induzida pelo PQ (Silva, Palmeira et al. 2015).

A partir deste estudo foi possível verificar que todos os compostos testados conseguem aumentar rápida e significativamente a atividade e expressão da P-gp, mostrando afinidade para ligação ao domínio de recombinação da P-gp, sendo a TX5 (**figura 11**) a que causou maior aumento da expressão da proteína e na atividade da bomba de efluxo (Silva, Palmeira et al. 2015). Foi também demonstrado que este aumento da expressão da P-gp resulta num aumento significativo da sua atividade. No entanto, o aumento da expressão da proteína pode nem sempre resultar necessariamente num aumento proporcional da atividade da bomba de efluxo, dado que o aumento da expressão não significa que a proteína esteja totalmente funcional (Silva, Carmo et al. 2011, Silva, Palmeira et al. 2015).

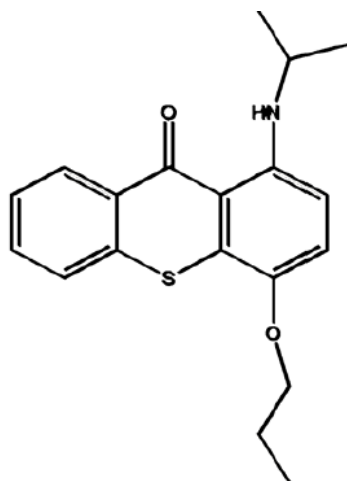


Figura 11 - Estrutura química das Tioxantonas. Adaptado de (Silva, Palmeira et al. 2015).

Os resultados deste estudo demonstraram também que estes derivados de TXs são ativamente transportados pela bomba de efluxo (Silva, Palmeira et al. 2015).

Em relação à capacidade destes compostos em proteger as células Caco-2 contra a toxicidade induzida pelo PQ, foi observado que em quatro dos compostos (TXs 2-5) os efeitos da indução tanto na expressão como na atividade resultaram numa proteção significativa contra a toxicidade do PQ, o que significa que estes compostos podem ter efeitos protetores contra intoxicações por PQ (Silva, Palmeira et al. 2015).

Podemos assim concluir que os derivados de Xs e TXs podem funcionar como base para criação de antídotos contra a citotoxicidade de substratos da P-gp, aumentando simultaneamente a expressão e atividade da P-gp. A sua capacidade para ativar a bomba de imediato proporciona uma proteção mais rápida e eficiente após a ingestão de um tóxico. De qualquer forma, ainda são necessários estudos em torno destas moléculas de forma a caracterizar melhor a sua habilidade e mecanismo de ação (Silva, Sousa et al. 2014).

Parte II

Objetivos do Trabalho

7. Objetivos do Trabalho

A P-gp encontra-se amplamente expressa no tecido epitelial humano. Devido à sua elevada capacidade de realizar o efluxo dos mais variados tipos de substratos, e à sua expressão polarizada em células de diversos tecidos com função barreira e excretora, pode desempenhar um papel crucial na limitação da absorção e distribuição de xenobióticos, diminuindo a concentração intracelular dos seus substratos.

A nível intestinal este mecanismo de defesa é particularmente relevante na redução da absorção intestinal de xenobióticos, sejam eles fármacos ou tóxicos. Já na BHE, a P-gp impede a entrada de determinados compostos, protegendo o cérebro da ação de determinadas toxinas, mas funcionando igualmente como obstáculo à entrada de fármacos com ação ao nível de patologias do SNC, como a epilepsia, VIH, infeções no SNC e tumores cerebrais.

A indução da expressão proteica ou o aumento da atividade deste transportador será um mecanismo eficaz no tratamento de intoxicações por substratos tóxicos desta glicoproteína.

Estudos anteriores demonstraram a capacidade de xantonas e tioxantonas, nomeadamente a recentemente descrita TX5, em aumentar a expressão e atividade da P-gp em células Caco-2, e de funcionar como ativador desta bomba de efluxo em células RBE4. No entanto, há ausência de informação sobre a capacidade deste composto atravessar as membranas. Assim, a presente tese tem como principal objetivo avaliar a capacidade deste composto em atravessar barreiras biológicas, nomeadamente a barreira intestinal e a BHE.

O trabalho laboratorial foi constituído por diferentes partes, partindo sempre da TX5 e variando-se outras condições como, a concentração do TX5 ou a linha celular exposta ao composto (células Caco-2 ou RBE4).

Os objetivos desta tese foram, assim, os seguintes:

- Determinar a citotoxicidade da TX5 em duas linhas celulares diferentes, as células Caco-2, modelo *in vitro* representativo da barreira intestinal humana, e as células RBE4, modelo *in vitro* representativo da BHE de rato, quando expostas ao derivado tioxantónico nas concentrações de 10 µM e 20 µM. No caso das células RBE4 a exposição ocorreu durante 8 horas, enquanto no caso das células Caco-2 a exposição ocorreu por um período de 24 h;

- Avaliar a potencial permeabilidade intestinal e cerebral da TX5, utilizando monocamadas de células Caco-2 e RBE4, respetivamente. Pretendeu-se, assim, avaliar a capacidade do derivado tioxantónico para atravessar as membranas celulares de ambas as linhas celulares, mediante a sua adição, numa concentração de 20 μM , na parte apical da monocamada celular e a avaliação da quantidade presente na parte basolateral ao longo de um período de 8 horas;
- Desenvolver uma metodologia para extração e quantificação da TX5 por LC-MS/MS.

Parte III

Material e Métodos

8. Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentadas todas as técnicas analíticas realizadas no âmbito do desenvolvimento do trabalho laboratorial.

Todos os procedimentos realizados em cultura celular tiveram em consideração as condições de assepsia e esterilidade adequadas e, portanto, foram realizados numa câmara de fluxo laminar vertical.

8.1 Síntese da Tioxantona 5 (TX5) e da Tioxantona 4 (TX4)

A TX5 e a TX4 foram sintetizadas pelo Laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (**figura 12**). A síntese destes derivados tioxantónicos foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Palmeira e colaboradores (2012), por acoplamento cruzado de Ullman (*Ullman cross-coupling*) entre 1-cloro-4-propoxi-9H-tioxanteno-9-ona e uma amina, em meio alcalino, utilizando aquecimento por micro-ondas. A pureza destes compostos foi determinada por análise de HPLC-DAD usando uma eluição isocrática com uma fase móvel constituída por MeOH:H₂O e alcalinizada com 1% de trietilamina (TEA), a um fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹ (Palmeira, Vasconcelos et al. 2012). Os compostos usados no presente trabalho laboratorial apresentavam uma pureza de pelo menos 95%.

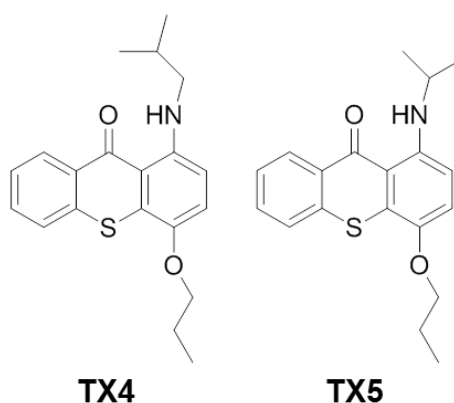


Figura 12 – Estrutura química da TX4 e TX5

8.2 Cultura Celular

8.2.1 Sementeira de células Caco-2 em placa de 96 poços

Reagentes:

- Meio de Cultura: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – High Glucose (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 100 μ M de aminoácidos não essenciais (NEAA, *non essential aminoacids*), 100 U/mL de penicilina, 100 ug/mL de estreptomicina, 2,5 ug/ml de anfotericina B e 6 ug / mL transferrina;
- Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) (-/-) (GIBCO, Paisley UK);
- Tripsina-0.25% / EDTA1 mM, com vermelho de fenol;

Material:

- Câmara de Neubauer;
- Microscópio ótico;
- Pipeta de 20 μ L;
- Pipeta de 100 μ L;
- Pipeta de 200 μ L;
- Pontas para pipetas automáticas;
- Pipetas graduadas de 5 mL, 10 mL, 25 mL;
- Placas de 96 poços;
- Placas de Petri;
- Frascos de cultura;
- Tubos de 10 e 50 mL;

Procedimento laboratorial:

- ✓ Por cada frasco T75cm² semear uma placa de 30 poços para MTT e outra para NR;
- ✓ Tripsinização das células:
 - Retirar os frascos de células Caco-2 da incubadora;
 - Remover o meio de cultura e lavar com HBSS (-/-) de modo a retirar todo o FBS (o qual inibe a tripsina);
 - Descartar o HBSS (-/-) e adicionar 3 mL de tripsina;
 - Incubar os frascos até as células estarem completamente desagregadas (visualizar ao microscópio);
 - Neutralizar a tripsina com 20 mL de meio DMEM e homogeneizar a suspensão celular;
 - Transferir a suspensão celular para um tubo de 50 mL;

- Contar as células na câmara de Neubauer e determinar qual o volume necessário de meio DMEM e de suspensão celular para obter a concentração de células desejada:
 - Para calcular o número de células por mililitro presente na suspensão celular determina-se o número médio de células contadas (contagem das células em diferentes quadrantes e divisão desse valor pelo número de quadrantes contados) e multiplica-se por 10000, tendo em conta os seguintes dados:
 - $1 \text{ mL} = 1 \text{ cm}^3$
 - $1 \text{ cm}^3 = 1 \times 10^3 \text{ mm}^3 = 1000 \text{ mm}^3$, então $1 \text{ mL} = 1000 \text{ mm}^3$
 - O volume da câmara é de 0.1 mm^3
 - Assim o número de células por mililitro é:
- Nº células/ml** = Número médio de células por quadrante x 10000
- Densidade celular para a sementeira das células Caco-2 = 60 000 células/cm²;
 - Área do poço da placa de 96 poços = 0,35 cm²;
 - De acordo com a densidade celular adequada e a área do poço, colocar 21 000 células/poço (150 µL);
 - Preparar uma suspensão celular com uma densidade de 140 000 células/mL;
 - Preparar suspensão celular com a densidade necessária para efetuar a sementeira (juntar meio DMEM e suspensão celular numa placa de petri e homogeneizar muito bem antes de semear as células);
 - ✓ Pipetar 150 µl de suspensão celular para cada poço;
 - ✓ Preencher 30 poços;
 - ✓ Efetuar o estudo de avaliação da citotoxicidade da TX5 três dias após a sementeira;

8.2.2 Sementeira de células RBE4 em placa de 96 poços

Reagentes:

- Meio de Cultura completo: mistura de meio *Minimum Essential Medium* (MEM) e meio Ham's F10 (1:1), suplementado com 300 ug/mL de neomicina, 10% de FBS, 1 ng/ml de bFGF (fator de crescimento), 100 U/ml de penicilina G, 100 ug/mL de estreptomicina, bicarbonato de sódio 25 mM e HEPES 25 mM;
- HBSS (-/-) (GIBCO, Paisley UK);
- HBSS (+/+) (GIBCO, Paisley UK);
- Tripsina-0.25% / EDTA 1 mM, com vermelho de fenol;
- Colagénio tipo I (de cauda de rato);

Material:

- Câmara de Neubauer;
- Microscópio ótico;
- Pipeta de 20 µL;
- Pipeta de 100 µL;
- Pipeta de 200 µL;
- Pontas para pipetas automáticas;
- Pipetas graduadas de 5 mL, 10 mL, 25 mL;
- Placas de 96 poços;
- Placas de Petri;
- Frascos de cultura (75 cm²);
- Tubos de 10 e 50 mL;

Procedimento laboratorial:

- ✓ Revestir os poços com 1% de colagénio:
 - 200 µl de colagénio por cada 20 mL de HBSS (+/+);
 - Em cada poço colocar 100 µL de solução;
 - Incubar a placa durante a noite;
- ✓ Por cada frasco T75cm² semear uma placa de 30 poços para MTT e outra para NR;
- ✓ Tripsinização das células:
 - Retirar os frascos de células RBE4 da incubadora;
 - Remover o meio e lavar com HBSS (-/-) de modo a retirar todo o FBS (que impede a tripsina de funcionar);
 - Descartar o HBSS (-/-) e adicionar 3 mL de tripsina;

- Incubar os frascos até as células estarem completamente desagregadas (visualizar ao microscópio);
- Neutralizar a tripsina com 20 mL de meio de cultura completo (com bFGF) e homogeneizar a suspensão celular;
- Transferir a suspensão celular para um tubo de 50 mL;
- Contar as células na câmara de Neubauer e determinar qual o volume necessário de meio de cultura completo (com bFGF) e de suspensão celular para obter a concentração de células desejada:
 - Densidade celular = 10000 células/poço/150 µL;
 - Preparar uma suspensão celular com uma densidade de 66700 células/mL;
- Preparar suspensão celular com a densidade necessária para efetuar a sementeira [juntar meio de cultura completo (com bFGF) e suspensão celular numa placa de petri e homogeneizar muito bem ante de semear as células];
- ✓ Lavar os poços com HBSS (+/+) para remover o colagénio não aderido;
- ✓ Pipetar 150 µl de suspensão celular para cada poço;
- ✓ Preencher 30 poços;
- ✓ Efetuar o estudo de avaliação da citotoxicidade da TX5 três dias após a sementeira;

8.3 Avaliação da Citotoxicidade da TX5

8.3.1 Exposição das Caco-2 à TX5

Reagentes:

- Meio de cultura: DMEM suplementado com 10% de FBS, 100 µM de NEAA, 100 U/mL de penicilina, 100 ug/mL de estreptomicina, 2,5 ug/ml de anfotericina B e 6 ug / mL transferrina;
- TX5 50 mM em DMSO;
- DMSO (Sigma-Aldrich, Inc., St.Louis, MO USA);

Material:

- Placas de 96 poços;
- Placas de Petri;
- Pipeta de 20 µL;
- Pipeta de 100 µL;
- Pipeta de 200 µL;
- Pipeta multicanal;
- Pontas para pipetas automáticas;

Procedimento laboratorial:

- ✓ Preparar a solução de TX5 1 mM:
 - 10 μ L TX5 50 mM + 490 μ L HBSS;
- ✓ Preparar a solução de TX5 20 μ M:
 - 60 μ L TX5 1 mM + 2,94 mL meio DMEM;
- ✓ Preparar a solução de TX5 10 μ M a partir da solução de TX5 20 μ M:
 - 1 mL da solução de TX5 20 μ M + 1 mL meio DMEM;
- ✓ Preparar a solução de DMSO a 0.04% (controlo de veículo):
 - 1 μ L DMSO + 2499 μ L meio DMEM;
- ✓ Preparar a solução de controlo positivo (Triton X-100, 1%):
 - 20 μ L Triton X-100 + 1.98 mL meio DMEM;
- ✓ O desenho da placa é o seguinte:
 - Primeira coluna – Controlo negativo (meio DMEM);
 - Segunda coluna – Controlo positivo;
 - Terceira coluna – Controlo de veículo (DMSO 0.04%);
 - Quarta coluna – TX5 10 μ M;
 - Quinta coluna – TX5 20 μ M;
- ✓ Pipetar 100 μ L de cada solução para o respetivo poço;
- ✓ Incubar 24 horas na estufa a 37 °C num ambiente com 5% CO₂;
- ✓ Após 24 horas, aspirar a solução de cada poço;
- ✓ Realizar os ensaios de avaliação da citotoxicidade: ensaio de redução do MTT e ensaio de redução do vermelho neutro (NR);

8.3.2 Exposição das RBE4 à TX5**Reagentes:**

- Meio de cultura MEM/Ham's F10 (1:1) com bFGF mas suplementado com 300 μ g/mL de neomicina, 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina G, 100 μ g/mL de estreptomicina, bicarbonato de sódio 25 mM e HEPES 25 mM;
- TX5 50 mM em DMSO;
- DMSO (Sigma-Aldrich, Inc., St.Louis, MO USA);

Material:

- Placas de 96 poços;
- Placas de Petri;
- Pipeta de 20 μL ;
- Pipeta de 100 μL ;
- Pipeta de 200 μL ;
- Pipeta multicanal;
- Pontas para pipetas automáticas;

Procedimento laboratorial:

- ✓ Preparar a solução de TX5 1 mM:
 - 10 μL TX5 50 mM + 490 μL HBSS;
- ✓ Preparar a solução de TX5 20 μM :
 - 60 μL de TX5 1 mM + 2,94 mL meio de cultura com fator crescimento;
- ✓ Preparar a solução de TX5 10 μM a partir da solução de TX5 20 μM :
 - 1 mL da solução de TX5 20 μM + 1 mL meio de cultura com fator de crescimento;
- ✓ Preparar a solução de DMSO a 0.04% (controlo de veículo):
 - 1 μL DMSO + 2499 μL meio MEM com fator de crescimento;
- ✓ Preparar a solução de controlo positivo (Triton X-100, 1%):
 - 20 μL Triton X-100 + 1.98 mL meio de cultura com fator de crescimento;
- ✓ O desenho da placa é o seguinte:
 - Primeira coluna – Controlo negativo (meio MEM);
 - Segunda coluna – Controlo positivo;
 - Terceira coluna – Controlo de veículo (DMSO 0.04%);
 - Quarta coluna – TX5 10 μM ;
 - Quinta coluna – TX5 20 μM ;
- ✓ Pipetar 100 μL de cada solução para o respetivo poço;
- ✓ Incubar 8 horas na estufa a 37 °C num ambiente com 5% CO_2 ;
- ✓ Após 8 horas, aspirar a solução de cada poço;
- ✓ Realizar os ensaios de avaliação da citotoxicidade: ensaio de redução do MTT e ensaio de redução do vermelho neutro (NR);

8.3.3 Estudos de Viabilidade Celular

8.3.3.1 Ensaio de redução do MTT

O ensaio de redução do MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio - método colorimétrico utilizado para quantificar espectrofotometricamente a viabilidade mitocondrial. Este ensaio permite avaliar a capacidade metabólica das células para reduzir o MTT, permitindo assim aferir se as células se encontram, ou não, metabolicamente ativas. O MTT (sal amarelo de tetrazólio) quando sujeito à ação da enzima redutase mitocondrial forma cristais de formazano de cor azul ou púrpura. Posteriormente, a adição de uma solução solubilizante (DMSO) permite a dissolução dos cristais formados dando origem a uma solução cuja absorvância é posteriormente quantificada espectrofotometricamente a 550 nm. Através da comparação das absorvâncias é possível verificar a toxicidade induzida pelo agente em estudo. Assim, a percentagem de redução do MTT em relação às células controlo (TX5 0 μ m) foi utilizada como medida da citotoxicidade.

Reagentes:

- Meio de cultura das células Caco-2: DMEM suplementado com 10% de FBS, 100 μ M de NEAA, 100 U/mL de penicilina, 100 ug/mL de estreptomicina, 2,5 ug/ml de anfotericina B e 6 ug / mL transferrina;
- Meio de cultura das células RBE4: MEM/Ham's F10 (1:1) sem bFGF mas suplementado com 300 ug/mL de neomicina, 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina G, 100 ug/mL de estreptomicina, bicarbonato de sódio 25 mM e HEPES 25 mM;
- MTT (Sigma Aldrich, Alemanha) 0.5 mg/mL em meio de cultura;
 - 500 μ l de solução stock de MTT (5 mg/mL) e 5 mL de meio de cultura;
- HBSS (+/+) (GIBCO, Paisley UK);
- DMSO (Sigma-Aldrich, Inc., St.Louis, MO USA);

Material:

- Placas de 96 poços;
- Agitador de placas;
- Leitor de placas;
- Agitador Magnético;
- Papel de prata;
- Pipeta multicanal;
- Pontas para pipetas automáticas;

Procedimento laboratorial:

- ✓ Preparar solução de MTT 0.5 mg/mL em meio de cultura;
- ✓ No final da incubação das células com a TX5 aspirar o meio de cultura contendo o composto;
- ✓ Pipetar 100 µL da solução MTT preparada para cada poço;
- ✓ Incubar a 37°C num ambiente com 5% de CO₂, durante 60 minutos para as células Caco-2 e 90 minutos para as células RBE4;
- ✓ Aspirar o meio contendo o MTT não metabolizado;
- ✓ Pipetar 100 µL de DMSO para cada poço;
- ✓ Colocar no agitador 15 minutos para a dissolução dos cristais formados;
- ✓ Ler absorvância no leitor de placas a 550 nm;

8.3.3.2 Ensaio de incorporação do Vermelho neutro

O ensaio de incorporação do Vermelho Neutro (NR, *neutral red*) é um método colorimétrico utilizado para quantificar espectralmente a viabilidade celular. Este ensaio baseia-se na capacidade das células viáveis em incorporar o corante NR. Este corante atravessa a membrana celular acumulando-se nos lisossomas das células viáveis. As células lesadas perdem a capacidade de reter o corante que é removido no procedimento de lavagem. A viabilidade celular é proporcional à concentração de corante presente nas células viáveis.

A absorvância é posteriormente quantificada espectralmente a 540 nm. Através da comparação das absorvâncias é possível verificar a toxicidade induzida pelo agente em estudo. Assim, a percentagem de incorporação do NR em relação à das células controlo (TX5 0 µm) foi utilizada como medida da citotoxicidade.

Reagentes:

- Meio de cultura das células Caco-2: DMEM suplementado com 10% de FBS, 100 µM de NEAA (*non essential aminoacids*), 100 U/mL de penicilina, 100 ug/mL de estreptomicina, 2,5 ug/ml de anfotericina B e 6 ug / mL transferrina;
- Meio de cultura das células RBE4: MEM/Ham's F10 (1:1) sem bFGF mas suplementado com 300 ug/mL de neomicina, 10% de FBS 100 U/ml de penicilina G, 100 ug/mL de estreptomicina, bicarbonato de sódio 25 mM e HEPES 25 mM;
- Vermelho neutro (NR) (Sigma Aldrich, Alemanha) 50 µg/mL em meio de cultura;
- HBSS (+/+) (GIBCO, Paisley UK);
- Solução de Lise (etanol absoluto / água destilada (1:1), com 1% de ácido acético);

Material:

- Placas de 96 poços;
- Agitador de placas;
- Leitor de placas;
- Agitador Magnético;
- Papel de prata;
- Pipeta multicanal;
- Pontas para pipetas automáticas;

Procedimento laboratorial:

- ✓ Preparar solução de NR 50 µg/mL em meio de cultura;
- ✓ No final da incubação das células com a TX5 aspirar o meio de cultura contendo o composto;
- ✓ Pipetar 100 µL da solução NR preparada para cada poço;
- ✓ Incubar a 37°C num ambiente com 5% de CO₂, durante 90 minutos tanto para as células Caco-2 como para as RBE4;
- ✓ Aspirar o meio;
- ✓ Lavar os poços com 200 µL de HBSS (+/+);
- ✓ Pipetar 200 µL de solução de lise em cada poço;
- ✓ Colocar no agitador 15 minutos;
- ✓ Ler absorvância no leitor de placas a 540 nm;

8.4 Avaliação da Permeabilidade da TX5**8.4.1 Cultura de células Caco-2 em *inserts*****Reagentes:**

- Meio de Cultura: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium – High Glucose* (DMEM) suplementado com 10% de FBS, 100 µM de NEAA (*non essential aminoacids*), 100 U/mL de penicilina, 100 ug/mL de estreptomicina, 2,5 ug/ml de anfotericina B e 6 ug / mL transferrina;
- HBSS (-/-) (GIBCO, Paisley UK);
- Tripsina-0.25% / EDTA1 mM, com vermelho de fenol;

Material:

- Câmara de Neubauer;
- Microscópio ótico;
- Pipeta de 20 μL ;
- Pipeta de 100 μL ;
- Pontas para pipetas automáticas;
- Pipetas graduadas de 5 mL, 10 mL, 25 mL;
- Placa de 12 poços BD Falcon com *inserts* para cultura celular constituídos por uma membrana de polycarbonato com um tamanho do poro de 0.4 μm ;

Procedimento laboratorial:

- ✓ Tripsinização das células Caco-2 previamente cultivadas em frasco de 75 cm^2 :
 - Retirar os frascos de células Caco-2 da incubadora;
 - Remover o meio de cultura dos frascos e lavar com HBSS (-/-);
 - Colocar 3 mL de tripsina;
 - Incubar os frascos até as células estarem completamente desagregadas (visualizar ao microscópio);
- ✓ Neutralizar a tripsina com 20 mL de meio de cultura e homogeneizar a suspensão celular;
- ✓ Transferir a suspensão celular para um tubo de 50 mL;
- ✓ Contar as células na câmara de Neubauer e determinar qual o volume necessário de meio DMEM e de suspensão celular para obter a concentração de células desejada;
- ✓ Fazer 3 *inserts* por cada frasco de células e em cada um dos *inserts* colocar 500 μL de suspensão celular na parte apical do poço e 1,5 mL de meio de cultura na parte basolateral (**figura 13**):
 - Densidade celular das células Caco-2 = 60 000 células/ cm^2 ;
 - Área do *insert* = 0,9 cm^2 ;
 - De acordo com a densidade celular adequada e a área do *insert* colocar 54 000 células/poço (500 μL) ►► preparar uma suspensão celular de células Caco-2 em meio de cultura contendo 108 000 células/mL;

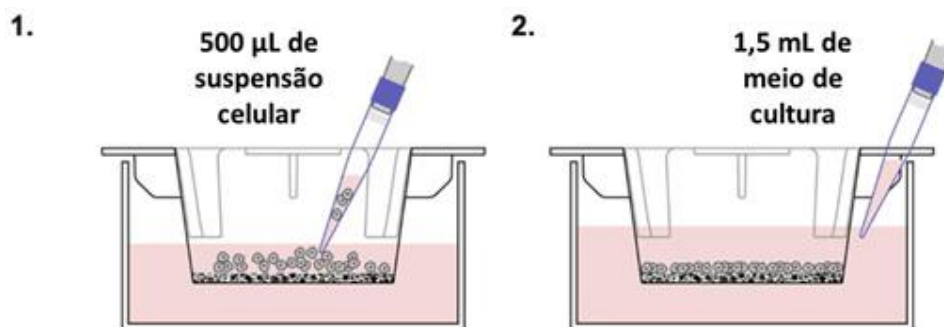


Figura 13 – Representação esquemática do processo de sementeira das células Caco-2 e RBE4 em *inserts*.

- ✓ Incubar a placa de 12 poços contendo os *inserts* a 37 °C numa atmosfera com 5% de CO₂;
- ✓ Mudar o meio de cultura da parte basolateral e apical do insert a cada 2 dias e medir a resistência transepitelial (TEER);
- ✓ Manter as células em cultura até o valor de TEER atingir 400 ohm (aproximadamente 21 dias);

8.4.2 Cultura de células RBE4 em *inserts*

Reagentes:

- Meio de Cultura completo: mistura de meio *Minimum Essential Medium* (MEM) e meio Ham's F10 (1:1), suplementado com 300 ug/mL de neomicina, 10% de FBS, 1 ng/ml de bFGF, 100 U/ml de penicilina G, 100 ug/mL de estreptomicina, bicarbonato de sódio 25 mM e HEPES 25 mM;
- HBSS (+/+) (GIBCO, Paisley UK);
- HBSS (-/-) (GIBCO, Paisley UK);
- Tripsina-0.25% / EDTA1 mM, com vermelho de fenol;
- Colagénio tipo I;

Material:

- Câmara de Neubauer;
- Microscópio ótico;
- Pipeta de 20 µL;
- Pipeta de 100 µL;
- Pontas para pipetas automáticas;
- Pipetas graduadas de 5 mL, 10 mL, 25 mL;
- Placa de 12 poços BD Falcon com *inserts* para cultura celular constituídos por uma membrana de polycarbonato com um tamanho do poro de 0.4 µm;

Procedimento laboratorial:

- ✓ Revestir os *inserts* com 1% de colagénio:
 - 200 µl de colagénio por cada 20 mL de HBSS (+/+);
 - Colocar 200 µL de solução de colagénio em cada *insert* (porção apical);
 - Incubar a placa durante a noite;
- ✓ No dia da sementeira aspirar a solução de colagénio dos *inserts*;
- ✓ Lavar os *inserts* com HBSS (+/+);
- ✓ Tripsinizar as células RBE4:
 - Retirar os frascos de células RBE4 da incubadora;
 - Remover o meio de cultura e lavar as células com HBSS (-/-);
 - Adicionar 3 mL de tripsina;
 - Incubar os frascos até as células estarem completamente desagregadas (visualizar ao microscópio);
 - Neutralizar a tripsina com 20 mL de meio de cultura completo (com bFGF) e homogeneizar a suspensão celular;
 - Transferir a suspensão celular para um tubo de 50 mL;
- ✓ Contar as células na câmara de Neubauer e determinar qual o volume necessário de meio de cultura completo (com bFGF) e de suspensão celular para obter a concentração de células desejada;
- ✓ Fazer 3 *inserts* por cada frasco de células e em cada um dos *inserts* colocar 500 µL de suspensão celular na parte apical do poço e 1,5 mL de meio de cultura completo na parte basolateral (**figura 13**):
 - Densidade celular das células RBE4 = 150 000 células/cm²;
 - Área do “insert” = 0,9 cm²;
 - De acordo com a densidade celular adequada e a área do insert colocar 135 000 células/poço (500 µL) ►► preparar uma suspensão celular de células RBE4 em meio de cultura completo contendo 270 000 células/mL;
- ✓ Incubar a placa de 12 poços contendo os *inserts* a 37 °C numa atmosfera com 5% de CO₂;
- ✓ Mudar o meio de cultura da parte basolateral e apical do insert a cada 2 dias e medir a resistência transepitelial (TEER);
- ✓ Manter as células em cultura até o valor de TEER atingir 200 ohms (aproximadamente 10 dias);

8.5 Medição da Resistência Elétrica Transepitelial (TEER, *Transepithelial Electrical Resistance*)

Método utilizado para medição da função de barreira epitelial e endotelial de uma determinada monocamada celular.

A medição da resistência transepitelial permite determinar se as células se encontram confluentes na placa e ao mesmo tempo se já estabeleceram entre si as junções estreitas que são necessárias para que os compostos não passem entre as células mas sim pelas células.

O valor de TEER é assim avaliado com recurso a um equipamento que fornece um determinado valor em Ohms, o qual indica um valor aproximado da resistência da monocamada epitelial.

Para se poder realizar a exposição das respetivas monocamadas celulares à TX5 as células Caco-2 devem apresentar valores de TEER superiores a 400 Ohms, enquanto as células RBE4 devem apresentar valores superiores a 200 Ohms.

Reagentes:

- Meio de Cultura das células RBE4: mistura de meio MEM e meio Ham's F10 (1:1), suplementado com 300 ug/mL de neomicina, 10% de FBS, 1 ng/ml de bFGF (fator de crescimento), 100 U/ml de penicilina G, 100 ug/mL de estreptomicina, bicarbonato de sódio 25 mM e HEPES 25 mM;
- Meio de Cultura das células Caco-2: DMEM suplementado com 10% de FBS, 100 µM de NEAA, 100 U/mL de penicilina, 100 ug/mL de estreptomicina, 2,5 ug/ml de anfotericina B e 6 ug / mL transferrina;
- Álcool a 70%;

Material:

- Tubos de 50 mL;
- Minivoltímetro EVOM2;

Procedimento laboratorial:

- ✓ Ligar o medidor da TEER e mergulhar os dois eléttodos num tubo plástico de 50 mL com álcool a 70%;
- ✓ Posteriormente mergulhar os eléttodos num tubo plástico com meio de cultura DMEM para o caso das células Caco-2 ou meio MEM/Ham's F10 para o caso das células RBE4;
- ✓ Retirar os eléttodos do tubo plástico e colocar os eléttodos num dos *inserts*, de modo a que o eléttodo maior fique na parte basolateral do *insert* (E1) e o eléttodo mais pequeno fique na parte apical do *insert* (E2), sem tocar na membrana celular, pois pode causar a sua destruição (**figura 14**);
- ✓ Manter os eléttodos mergulhados de modo a que o aparelho mostre um valor de TEER constante;

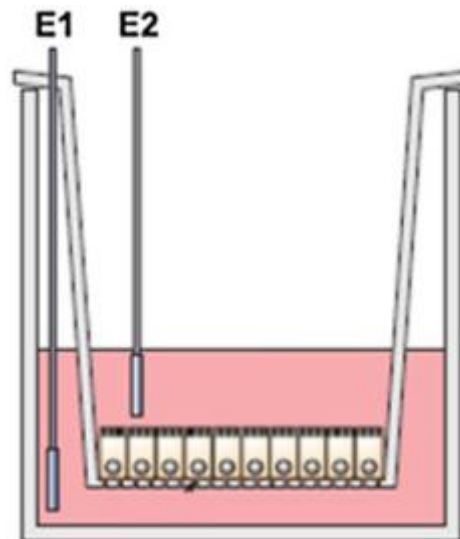


Figura 14 — Representação esquemática da medição do valor de TEER

- ✓ Posteriormente, retirar os eléttodos do *insert* e mergulhá-los em álcool a 70%;
- ✓ Caso se queira realizar a medição do valor de TEER de outro *insert* voltar a mergulhar os eléttodos em meio de cultura e repetir o processo de medição;

8.6 Exposição das monocamadas de células Caco-2 e RBE4 à TX5 – avaliação da permeabilidade do composto numa monocamada celular íntegra

Reagentes:

- HBSS (+/+) (GIBCO, Paisley UK)
 - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/L
 - CaCl_2 (anidro) 140 mg/L
- TX5 20 μM preparado em HBSS (+/+);

Material:

- Pipeta de 200 μL ;
- Pipeta de 1000 μL ;
- Pontas para pipetas automáticas;
- *Eppendorfs*;

Procedimento laboratorial:

- ✓ Aspirar o meio de cultura da parte basolateral e apical dos *inserts*;
- ✓ Lavar os *inserts* 2x com HBSS (+/+) (1 mL na parte apical e 1 mL na parte basolateral);
- ✓ Adicionar 500 μL de solução de TX5 na concentração de 20 μM na parte apical de cada um dos *inserts* (a solução de TX5 é preparada imediatamente antes da sua utilização);
- ✓ Adicionar 1 mL de solução de HBSS (+/+) na parte basolateral;
- ✓ Em todas as amostragens retirar 200 μL da parte basolateral do *insert* e colocar no respetivo eppendorf;
- ✓ Realizar amostragens a diferentes tempos:
 - a. Na 1ª hora de 20 em 20 minutos;
 - b. Na 2ª hora de 30 em 30 minutos;
 - c. Na 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª hora de hora em hora;
- ✓ Repor o volume retirado da parte basolateral do *insert* com 200 μL de HBSS (+/+);
- ✓ Na 8ª hora retirar a totalidade do HBSS (+/+) presente na parte basolateral do *insert* e a totalidade da solução de TX5 presente na parte apical do *insert*;
- ✓ Lavar a monocamada de células com HBSS (+/+);
- ✓ Ressuspender a monocamada de células em 200 μL de HBSS (+/+) e centrifugar durante 10 minutos a 2000 rpm (4 °C) de modo a ficar com um sedimento de células;

- ✓ Retirar o sobrenadante e armazenar o *pellet* celular e as amostras recolhidas nos diferentes tempos a -80°C até posterior extração para quantificação da concentração de TX5;
- ✓ Foram efetuadas 4 experiências independentes, com 3 inserts por experiência;

8.7 Desenvolvimento de uma metodologia para análise e quantificação da TX5

No presente trabalho foi desenvolvida uma metodologia de LC-MS/MS para a análise e quantificação da TX5. O desenvolvimento da referida metodologia exigiu a otimização de vários parâmetros como: a seleção e concentração do padrão interno, a metodologia de extração, composição e fluxo da fase móvel, volume de injeção, determinação dos tempos de retenção, condições de ionização e condições de fragmentação. Dada a semelhança estrutural, a TX4 foi selecionada como padrão interno (PI), tendo sido igualmente otimizadas as condições para a sua extração e deteção no sistema de LC-MS/MS.

8.7.1 Otimização das condições cromatográficas e de deteção no detetor de massa

As condições de operação foram otimizadas em duas etapas principais, otimização das condições de deteção no espectrómetro de massa (MS) e otimização das condições cromatográficas no LC-MS/MS. A primeira fase tem por objetivo a obtenção do ião precursor, resultante da ionização do analito, e a obtenção dos respetivos iões produto [fragmentos da molécula original caracterizados pela sua razão massa:carga (m/z)]. Esta primeira fase foi realizada no espectrómetro de massa através da análise de soluções padrão individuais dos compostos alvo, TX4 e TX5, preparadas numa concentração de 10 μM em metanol. Para otimizar as condições de obtenção do ião precursor e dos iões produto, as soluções padrão individuais foram injetada por infusão direta no espectrómetro de massa a um fluxo de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Numa segunda fase, e uma vez definidas as condições iniciais de operação para o espectrómetro de massa, foi avaliado o comportamento dos compostos no sistema completo de LC-MS/MS, e definidos os respetivos parâmetros cromatográficos (composição e fluxo da fase móvel). Foram igualmente validadas e aperfeiçoadas as condições de obtenção dos iões produto (voltagem do cone e a energia de colisão) no sistema completo LC-MS/MS por injeção de 10 μL de cada uma das soluções metanólicas referidas anteriormente. A operação do equipamento e a aquisição de dados foram obtidas com o software MassLynxTM V4.1 e o processamento dos dados efetuado com recurso ao software QuanLynxTM V4.1.

8.7.1.1 Condições instrumentais e Cromatográficas

O equipamento utilizado para análise e quantificação da TX5 foi Waters ACQUITY UPLC™ System (UPLC) e Waters Quattro Premier™ XE benchtop tandem quadrupole mass spectrometer (detetor de massa).

A separação dos compostos foi conseguida mediante a utilização da coluna VDSpher PUR C18-SE, 3.5 µm de diâmetro de partículas e 75 x 4,6 mm de dimensão. O volume de injeção de amostras e padrões foi sempre de 10 µL.

8.7.1.2 Otimização dos parâmetros de fragmentação – ajuste da voltagem do Cone e da Energia de Colisão

A otimização dos parâmetros de fragmentação foi realizada com o objetivo de selecionar as melhores condições de fragmentação dos iões moleculares na análise por espetrometria de massa. Para o efeito, foram realizadas infusões diretas no espetrómetro de massa, a um fluxo de 20 µL/min, com uma solução analítica na concentração de 10 µM (preparada em metanol) de cada derivado tioxantónico em estudo, TX4 e TX5. Os parâmetros avaliados foram: a voltagem do cone (C) e a energia de colisão (EC). A etapa de otimização das condições de fragmentação foi determinante para selecionar os iões a serem monitorizados para qualificação e quantificação dos compostos em análise. A **tabela 8** apresenta os parâmetros previamente definidos e mantidos durante a fase de otimização da voltagem de cone e da energia de colisão. O equipamento foi operado no modo de ionização ESI+ (*electrospray* positivo).

Tabela 8 – Condições previamente definidas para o espetrómetro de massa.

Gás de nebulização, dessolvatação e de cone	Azoto
Gás de colisão	Árgon
Ionização	Electrospray
Extrator (V)	2
Energia de ionização – voltagem do capilar (kV)	3,5
Temperatura da fonte (°C)	100
Temperatura de dessolvatação (°C)	250
Fluxo do gás de dessolvatação (L/h)	300
Fluxo do gás no cone (L/h)	50

As condições de voltagem de cone variaram inicialmente entre 35 e 45 V (35, 40 e 45) e a energia de colisão entre 22 e 28 (22, 23, 25, 26, 27 e 28 eV). Após a otimização destes parâmetros por infusão direta no espectrómetro de massa, e após a otimização da fase móvel (ver **secção 2.7.1.3**) o processo de otimização dos parâmetros acima referidos foi aperfeiçoado no sistema completo LC-MS/MS, com recurso à injeção de soluções metanólicas de TX5 e TX4 (10 µM) no UPLC (volume de injeção 10 µL) e com a monitorização dos respetivos sinais analíticos obtidos no espectrómetro de massa [área dos picos dos dois fragmentos maioritários de cada composto – iões 244 e 286 (m/z)]. O equipamento foi operado no modo de ionização ESI+ (*electrospray* positivo) e no modo MRM (*multiple reaction monitoring*). Assim, considerando que a monitorização inicial por infusão direta determinou que a melhor voltagem de cone para ambos os compostos era de 40 V e que a energia de colisão que permitia a visualização de 10% do ião molecular era de 25 e 27 eV para o TX5 e TX4, respetivamente, foram criadas múltiplas funções MRM em que, para cada composto, foram inicialmente fixadas as energias de colisão acima referidas e feito variar o valor de voltagem do cone em +2, -2, +5, -5, +10 e -10 V relativamente ao valor de 40V fixado anteriormente. Após a seleção da voltagem de cone mais adequada para cada composto, procedeu-se à seleção da energia de colisão que permitia a obtenção de um sinal analítico mais intenso para cada um dos dois fragmentos maioritários de cada composto – os iões 244 e 286 (m/z). Assim, procedeu-se à injeção no UPLC das mesmas soluções padrão acima referidas (volume de injeção 10 µL), sendo a monitorização efetuada com múltiplas funções MRM fazendo variar a energia de colisão previamente definida na infusão direta (25 eV para o TX5 e 27 eV para o TX4) em +2, -2, +5, -5, +10 e -10 eV.

8.7.1.3 Ajuste da Fase Móvel

A seleção e ajuste da composição de uma fase móvel adequada a um determinado estudo analítico têm como principal objetivo a separação dos analitos em estudo, com a obtenção de picos simétricos e num curto período de tempo. A fase móvel, inicialmente testada no âmbito do presente trabalho experimental, teve por base estudos anteriores efetuados no Laboratório de Toxicologia nos quais se procedeu ao desenvolvimento e validação de uma metodologia de HPLC para análise e quantificação da TX5 em amostras biológicas (soro humano). Contudo, o método anteriormente desenvolvido e validado apresentava um limite de deteção insuficiente face às reduzidas concentrações de TX5 utilizadas no âmbito dos estudos de permeabilidade (20 µM) e, por este motivo, no presente trabalho, desenvolveu-se uma metodologia para analisar e quantificar a TX5 com recurso a um equipamento de UPLC acoplado a um detetor de

massa (LC-MS/MS). Tendo por base o referido estudo anterior, a fase móvel testada inicialmente era constituída por 10 % de solvente A (água) e 90 % de solvente B (metanol) com acetato de amónio 5 mM, em modo isocrático, a um fluxo inicial de 0,3 ml/min. O acetato de amónio foi adicionado à fase móvel (solvente A e solvente B) para facilitar a ionização dos compostos no espectrómetro de massa. Os estudos de ajuste da composição da fase móvel tiveram por base a avaliação do efeito da redução da percentagem da fase aquosa na eficiente separação dos analitos em estudo (TX4 e TX5) e na resolução dos respetivos picos cromatográficos. Assim, foi igualmente testada uma fase móvel constituída por 5% de solvente A (água) e 95 % de solvente B (metanol), com acetato de amónio 5 mM. Para ambas as fases móveis testadas foi igualmente avaliado o efeito do fluxo da fase móvel na resolução e separação dos picos cromatográficos. Para o efeito, foram testados dois fluxos distintos: 0,3 e 0,4 ml/min.

8.7.2 Desenvolvimento de uma metodologia para extração da TX5 das amostras de HBSS recolhidas nos estudos de permeabilidade

8.7.2.1 Seleção do Solvente Orgânico e avaliação do efeito do pH no rendimento extrativo

Inicialmente foi necessário realizar a seleção do solvente orgânico que permitisse uma extração mais eficiente do analito em estudo – a TX5. Foram assim testados dois solventes orgânicos distintos, o Acetato de Etilo (AE) e o Éter de Etilo (EE), e efetuada a comparação das áreas dos picos correspondentes a cada um dos dois fragmentos maioritários da TX5 [iões 244 e 286 (m/z)] obtidas após injeção de 10 µL de padrão de TX5 0.5 µM preparado em HBSS e submetido ao processo extrativo (com AE ou EE), com as áreas obtidas após a injeção de 10 µL de padrão de TX5 0.5 µM preparado diretamente em metanol (sem extração).

Reagentes:

- Éter de Etilo;
- Acetato de Etilo;
- TX5 0,5 µM em metanol;
- TX5 0,5 µM em HBSS (+/+);
- HBSS (GIBCO, Paisley UK);
- HBSS (+/+) com pH 12,5;
- Metanol;

Material:

- Pipeta de 200 μL ;
- Pipeta de 1000 μL ;
- Pontas para pipetas automáticas;
- Agitador de amostras;
- Concentrador de amostras;

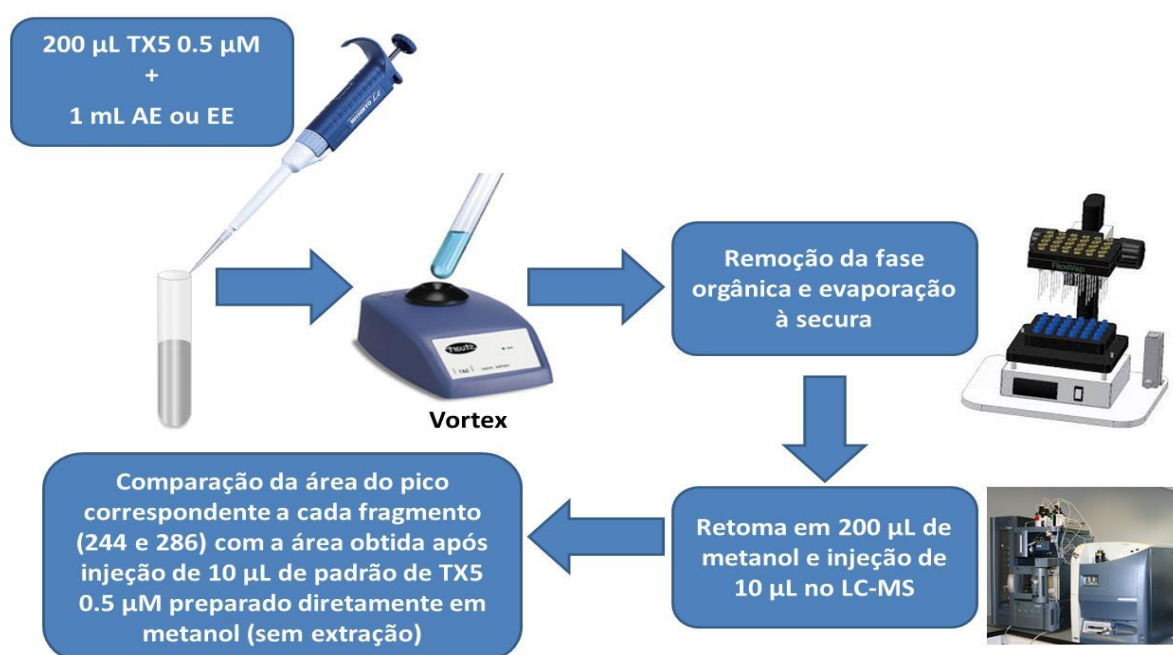
Procedimento laboratorial:

Figura 15 - Procedimento realizado para a seleção do solvente orgânico.

Posteriormente, foi avaliado o efeito do pH no rendimento extrativo. Para o efeito, o padrão de TX5 0.5 μM em HBSS (+/+) foi inicialmente alcalinizado mediante a adição de HBSS (+/+) com pH 12,5 e, posteriormente, submetido ao processo extrativo com AE ou EE). Foi igualmente testado o efeito de uma segunda extração sequencial com 1 mL adicional de solvente orgânico no rendimento extrativo. Assim, após a remoção fase orgânica (1 mL de AE ou EE) foi realizada uma repetição da extração com mais 1 mL de solvente orgânico. Os ensaios de avaliação do efeito do pH e do número de extrações sequenciais foram realizados em triplicado.

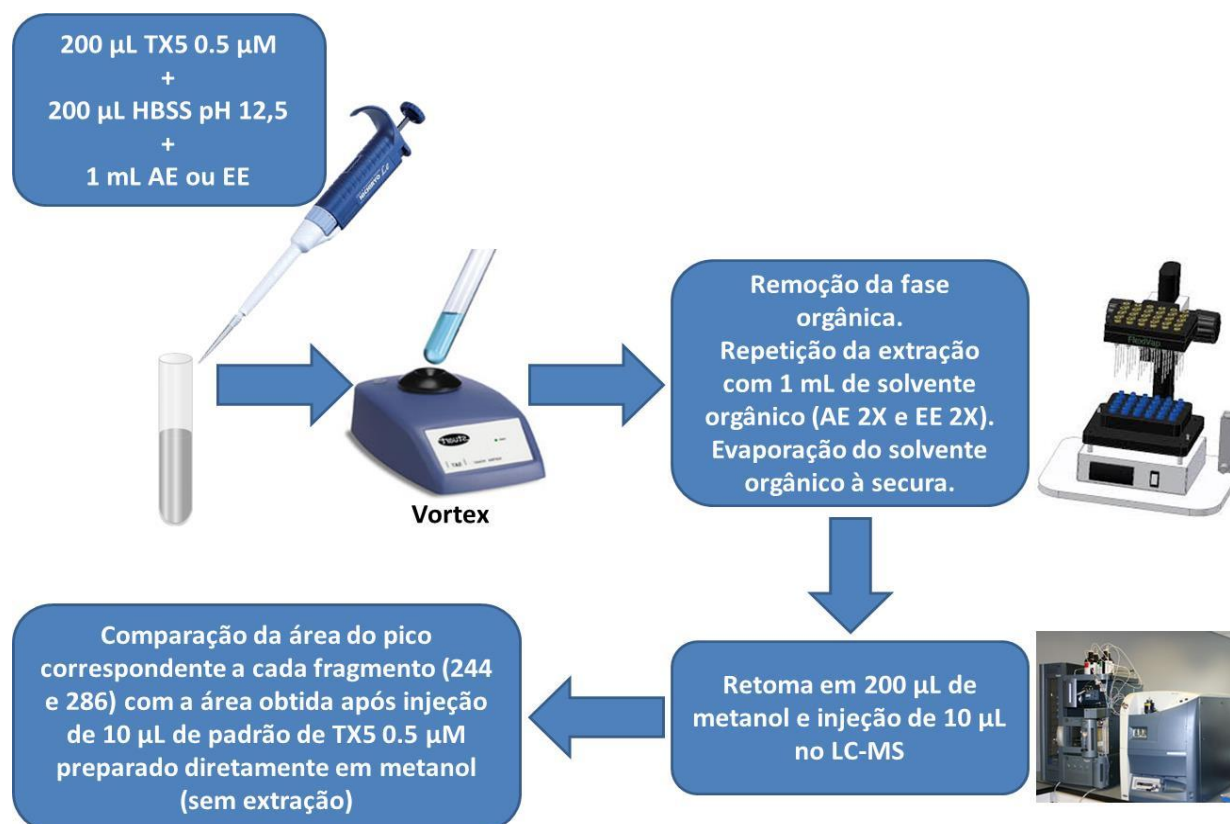
Procedimento laboratorial:

Figura 16 - Procedimento realizado para a seleção do solvente orgânico e para a avaliação do efeito do pH e do número de extrações sequenciais no rendimento extrativo da TX5.

8.7.2.2 Avaliação do efeito da temperatura no rendimento extrativo

Após a seleção do solvente orgânico foi avaliado o efeito da temperatura no rendimento extrativo. Assim, após a adição do solvente orgânico (AE) as amostras foram sujeitas a um processo de aquecimento a 40 °C durante 10 minutos. Após conclusão do processo extrativo foi efetuada a comparação das áreas dos picos cromatográficos obtidos para os dois fragmentos da TX5 [iões 244 e 286 (m/z)] com as áreas obtidas ao processo extrativo mas sem a referida etapa de aquecimento. Este estudo foi efetuado, em triplicado, com padrões de TX5 5 µM preparados em HBSS (+/+).

Reagentes:

- Acetato de Etilo;
- HBSS (+/+) (GIBCO, Paisley UK);
- HBSS (+/+) com pH 12,5;
- TX5 0,5 μ M em HBSS (+/+);
- TX5 0,5 μ M em metanol;
- Metanol;

Material:

- Pipeta de 200 μ L;
- Pipeta de 1000 μ L;
- Pontas para pipetas automáticas;
- Agitador de Amostras;
- Concentrador de Amostras;

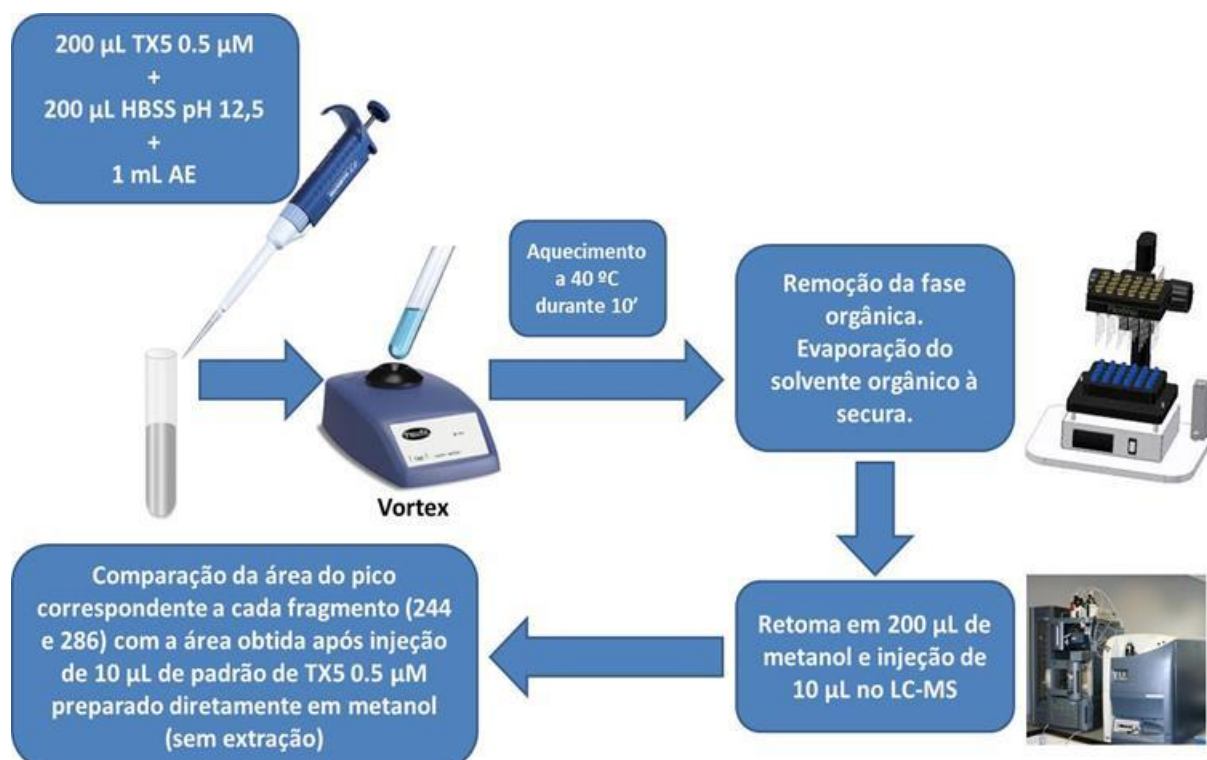
Procedimento laboratorial:

Figura 17 – Procedimento realizado para a avaliação do efeito da temperatura no rendimento extrativo da TX5.

8.7.2.3 Avaliação do rendimento extrativo do Padrão Interno

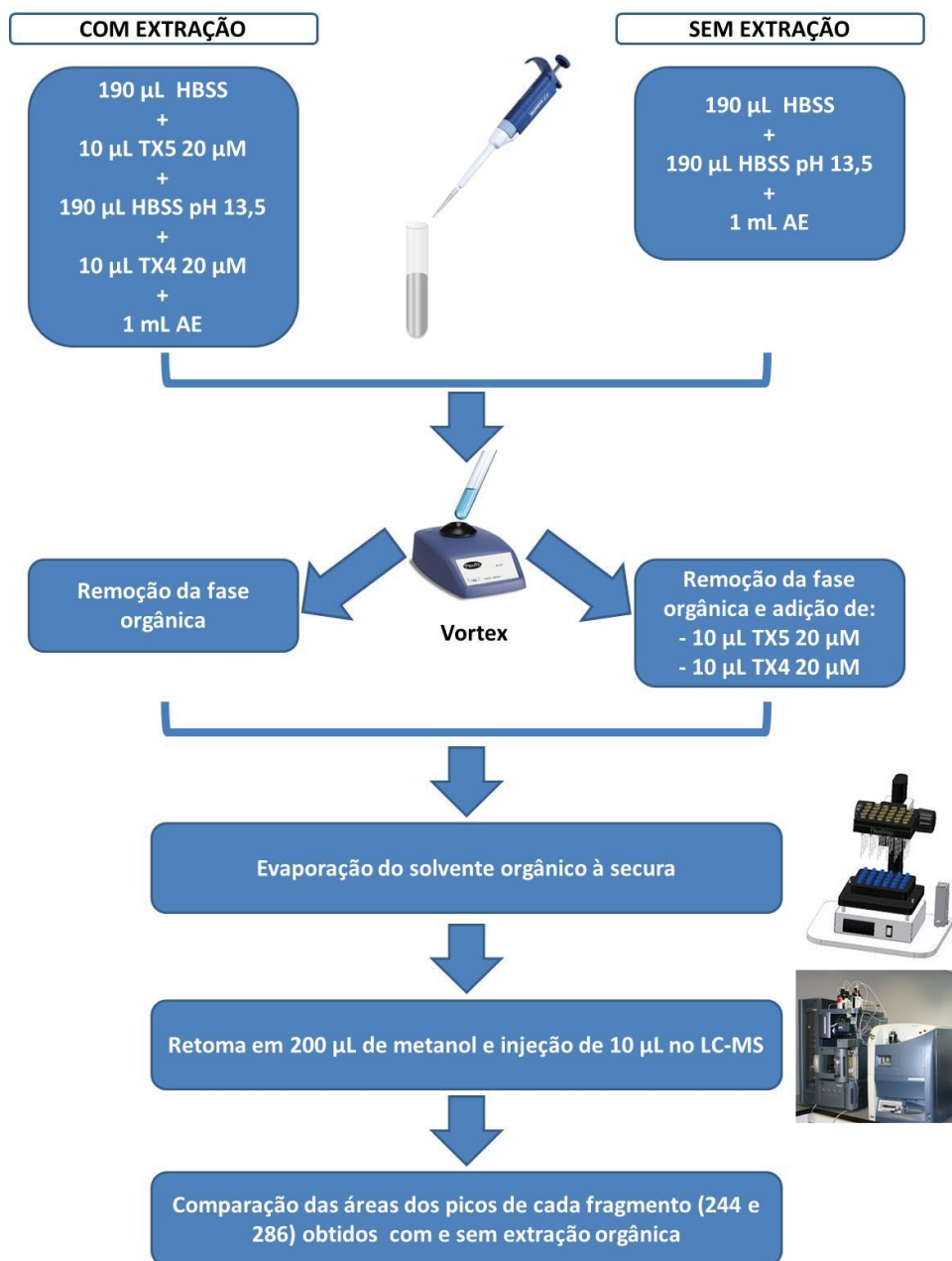
Tendo por base a estrutura química da TX5 foi, como anteriormente referido, selecionado um derivado tioxantónico estruturalmente semelhante como padrão interno, a TX4. O PI utilizado num determinado procedimento analítico, além de ser utilizado numa concentração conhecida e de ter uma estrutura semelhante ao analito em estudo, deve apresentar um comportamento cromatográfico idêntico (embora com eficiente separação), assim como um idêntico rendimento extrativo. Para o efeito, foi avaliado o rendimento extrativo simultâneo da TX4 e da TX5 em concentrações equimolares, assim como o efeito de um novo aumento do pH para 13,5. O presente estudo foi efetuado em triplicado.

Reagentes:

- Acetato de Etilo;
- HBSS (+/+) (GIBCO, Paisley UK);
- HBSS (+/+) pH 13,5;
- TX5 20 μ M em metanol;
- TX4 20 μ M em metanol;
- Metanol;

Material:

- Pipeta de 200 μ L;
- Pipeta de 1000 μ L;
- Pontas para pipetas automáticas;
- Agitador de Amostras;
- Concentrador de Amostras;

Procedimento laboratorial:**Figura 18** – Procedimento realizado para a avaliação do rendimento extrativo da TX5 e da TX4.

8.7.2.4 Ensaio de Recuperação Final

Os ensaios de recuperação consistem na avaliação da percentagem que é perdida no manuseamento das amostras. Esta recuperação é avaliada mediante a comparação do sinal analítico obtido (área do pico) quando os compostos em estudo são adicionados antes ou depois do processo extrativo. Ou seja, é calculada a percentagem de recuperação do analito por comparação com o sinal analítico obtido para uma mesma concentração de analito não submetido ao processo extrativo, e que por isso, representa 100 % de recuperação. Tendo por base os estudos preliminares acima referidos (seleção do solvente orgânico, temperatura, pH do processo extrativo), foi efetuado o ensaio de recuperação final para diferentes concentrações de TX4 e TX5. O ensaio de recuperação foi efetuado simultaneamente para a TX5 e para o padrão interno (TX4) de forma a assegurar, tal como referido anteriormente, que este último derivado tioxantónico apresenta um comportamento extrativo idêntico ao analito em estudo (TX5), demonstrando, assim, a sua utilidade como padrão interno.

Reagentes:

- Acetato de Etilo;
- TX4 (0,2; 2; 20; 200 μ M) em metanol;
- TX5 (0,2; 2; 20; 200 μ M) em metanol;
- HBSS (+/+) (GIBCO, Paisley UK);
- HBSS (+/+) pH 13,5;
- Metanol;

Material:

- Pipeta de 20 μ L;
- Pipeta de 100 μ L;
- Pipeta de 200 μ L;
- Pontas para pipetas automáticas;
- Concentrador de amostras;
- Agitador de amostras;

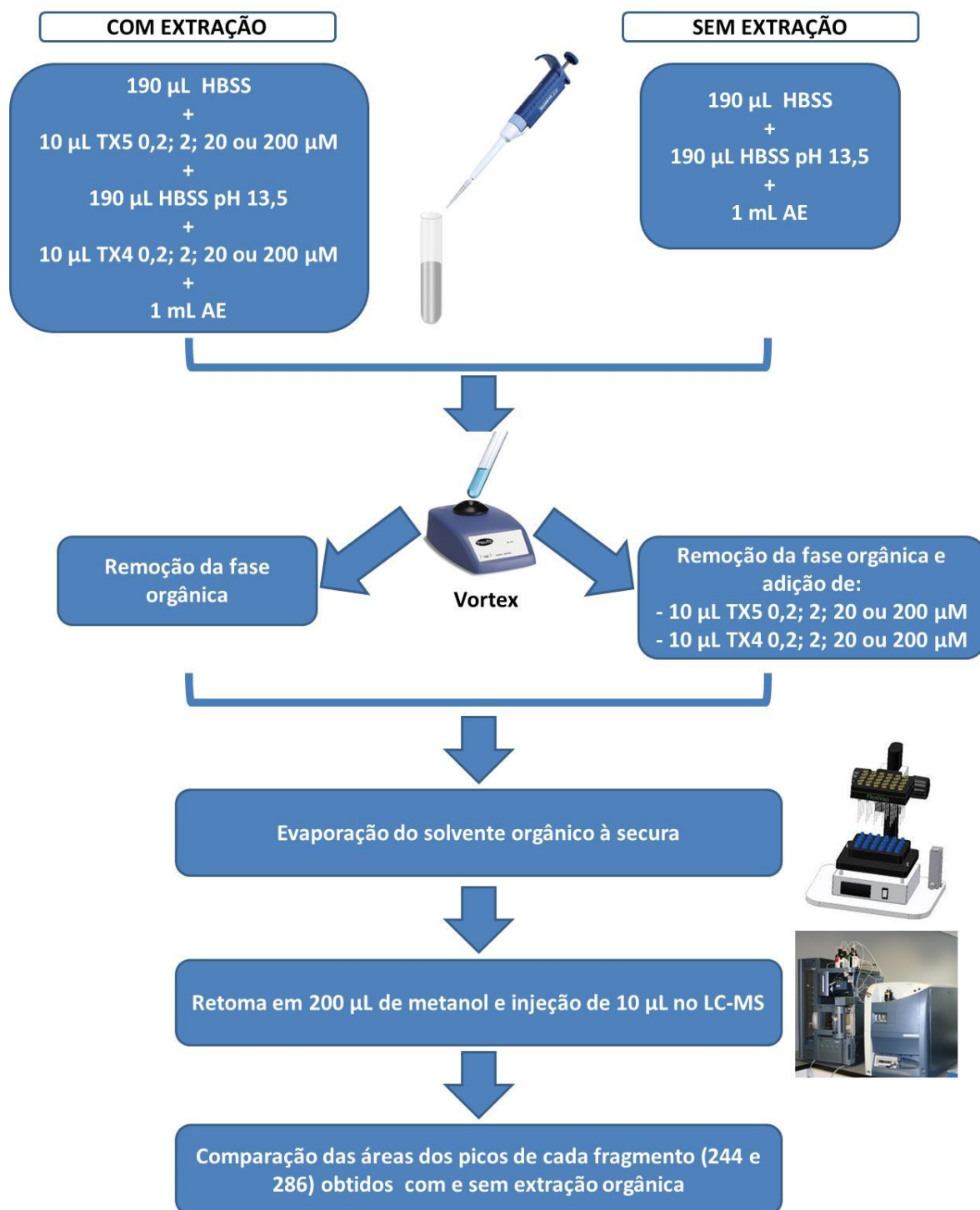
Procedimento laboratorial:

Figura 19 – Procedimento realizado para a avaliação do rendimento extrativo da TX5 e da TX4, em diferentes concentrações.

8.7.3 Extração da TX5 Intracelular

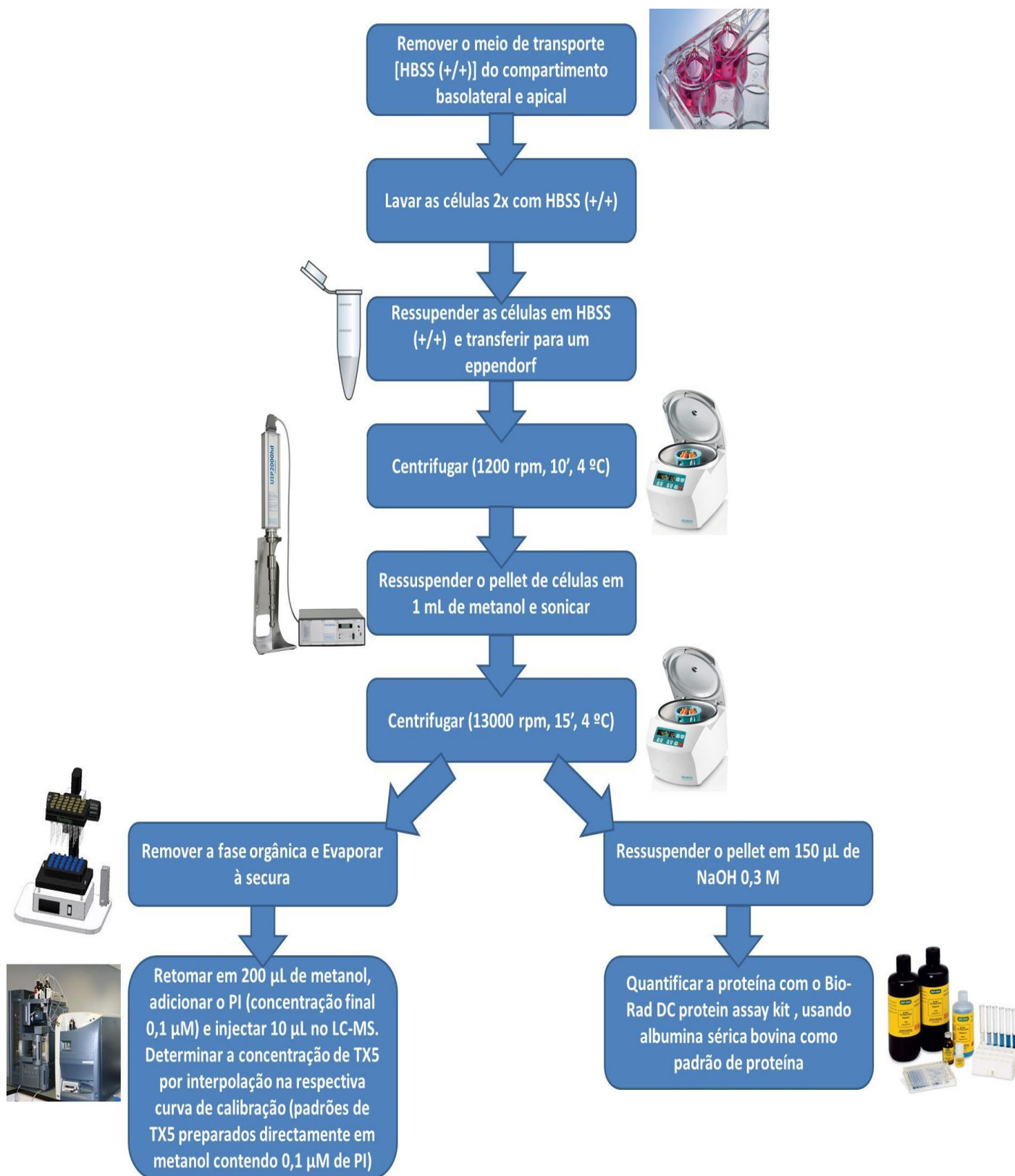
O procedimento para extração da TX5 intracelular no final das 8h do ensaio de permeabilidade com monocamadas de células Caco-2 e RBE4 foi ligeiramente simplificado comparativamente à sua extração do HBSS recolhido da porção basolateral e apical dos *inserts*. Neste procedimento, efectuou-se a lise celular e extração do derivado tioxantónico com metanol.

Reagentes:

- Metanol;
- NaOH 0,3 M;
- Padrão Interno (TX4) 0,1 μ M;
- TX5 (0,005;0,01;0,05; 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 μ M) em metanol;

Material:

- Pipeta de 200 μ L;
- Pipeta de 1000 μ L;
- Pontas para pipetas automáticas;
- *Eppendorf*;
- Centrífuga de eppendorfs;
- Concentrador de amostras;
- Sonda de ultrassons;

Procedimento laboratorial:**Figura 20 – Protocolo para extração da TX5 Intracelular**

8.7.4 Quantificação do teor de Proteína das Amostras

Após extração da TX5 com metanol e centrifugação das amostras, o *pellet* obtido foi utilizado para quantificação do teor proteico, com o objetivo de normalizar a quantidade de TX5 detetada por mg de proteína. Para o efeito, utilizou-se um kit disponível comercialmente - *Bio-Rad DC Protein Assay kit*. Trata-se de um ensaio colorimétrico para a determinação da concentração de proteína numa amostra, recorrendo a uma reação semelhante a um ensaio muito bem documentado na literatura, o método de Lowry. O ensaio é baseado na reação da proteína com uma solução de tartarato de cobre alcalino e reagente de Folin. Tal como no ensaio de Lowry, existem dois passos que levam ao desenvolvimento de cor: a reação entre a proteína e o cobre em meio alcalino e a subsequente redução de reagente Folin pela proteína tratada com cobre. Forma-se, então, uma coloração azul característica com uma absorvância máxima a 750 nm.

Material:

- Pipeta de 20 µL;
- Pipeta de 200 µL;
- Pontas para pipetas automáticas;
- Vortex;
- *Bio-Rad DC Protein Assay kit*;
- Leitor de Placas;

Reagentes:

- NaOH 0,3 M (para dissolução do pellet celular e preparação dos padrões de proteína para a curva de clibração);
- Albumina Sérica Bovina (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; e 1,2 mg/mL em NaOH 0,3 M);
- Reagente A e B do *Bio-Rad DC Protein Assay kit*;

Procedimento laboratorial:

- Pipetar 10 µl de cada padrão e amostra para uma placa de 96 poços (em triplicado);
- Adicionar 25 µl de reagente A a cada poço;
- Adicionar 200 µl de reagente B a cada poço e agitar a placa durante 5 segundos no leitor de placas;
- Após 15 minutos, ler a absorvância a 750 nm no leitor de placas;

8.7.5 Ensaios de Linearidade

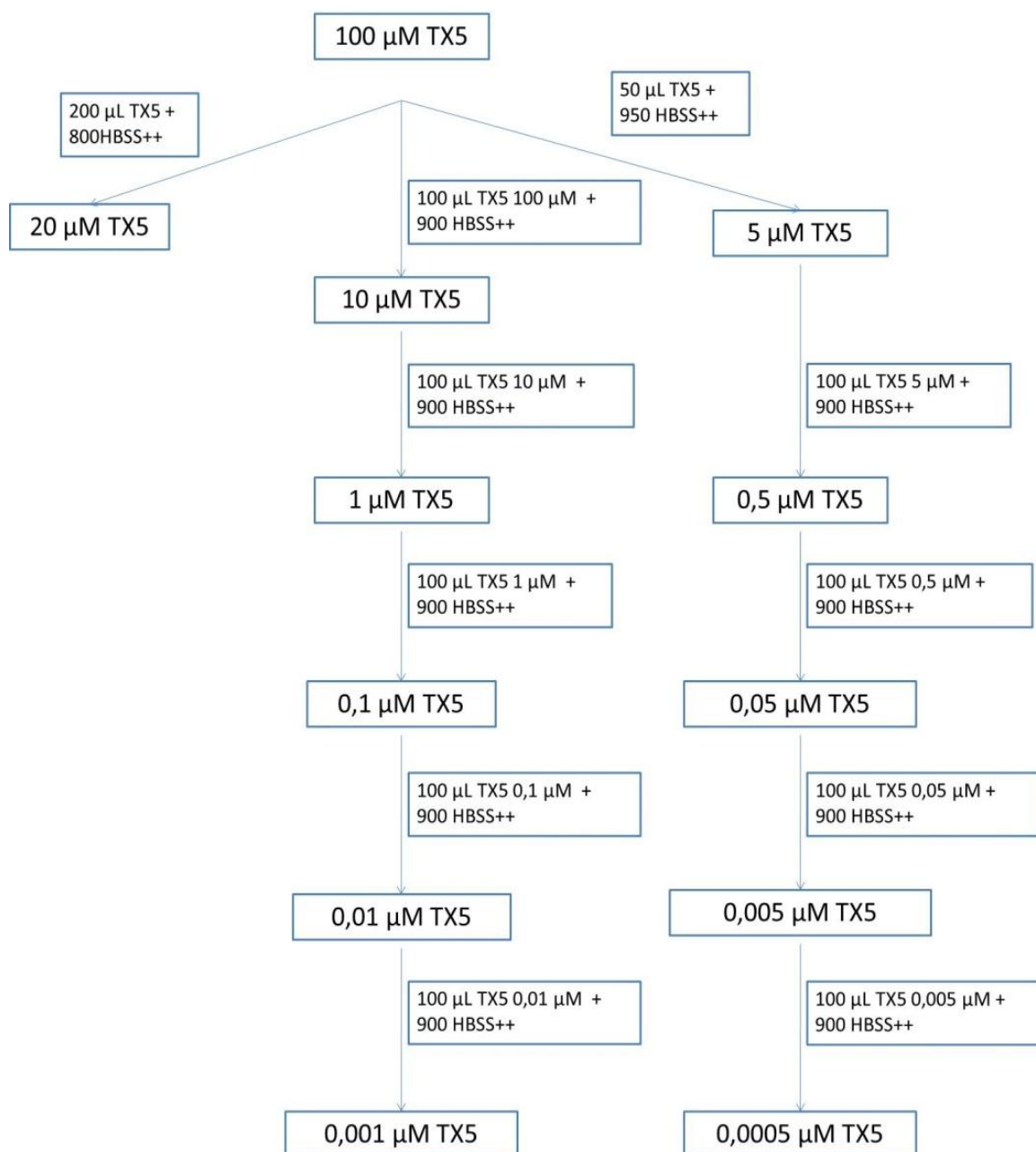
8.7.5.1 Preparação dos Padrões de TX5 em HBSS (+/+)

Material:

- Pipeta de 20 μL ;
- Pipeta de 100 μL ;
- Pipeta de 200 μL ;
- Pontas para pipetas automáticas;

Reagentes

- HBSS (+/+) (GIBCO, Paisley UK);
- TX5 100 μM em HBSS (+/+);

Procedimento laboratorial:**Figura 21** – Representação da preparação de padrões TX5 em HBSS (+/+).

8.7.6 Avaliação da linearidade de resposta do detetor e seleção da concentração ideal de padrão interno

Reagentes:

- TX4 0.1 e 1 μM em HBSS (+/+) pH 13,5;
- TX5 (0,005;0,01;0,05; 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 μM) em HBSS (+/+) pH 7,4;
- Acetato de Etilo;
- HBSS (+/+) (GIBCO, Paisley UK);
- HBSS (+/+) pH=13,5;
- Metanol;

Material:

- Pipeta de 20 μL ;
- Pipeta de 100 μL ;
- Pipeta de 200 μL ;
- Pontas para pipetas automáticas;
- Concentrador de amostras;
- Agitador de amostras;

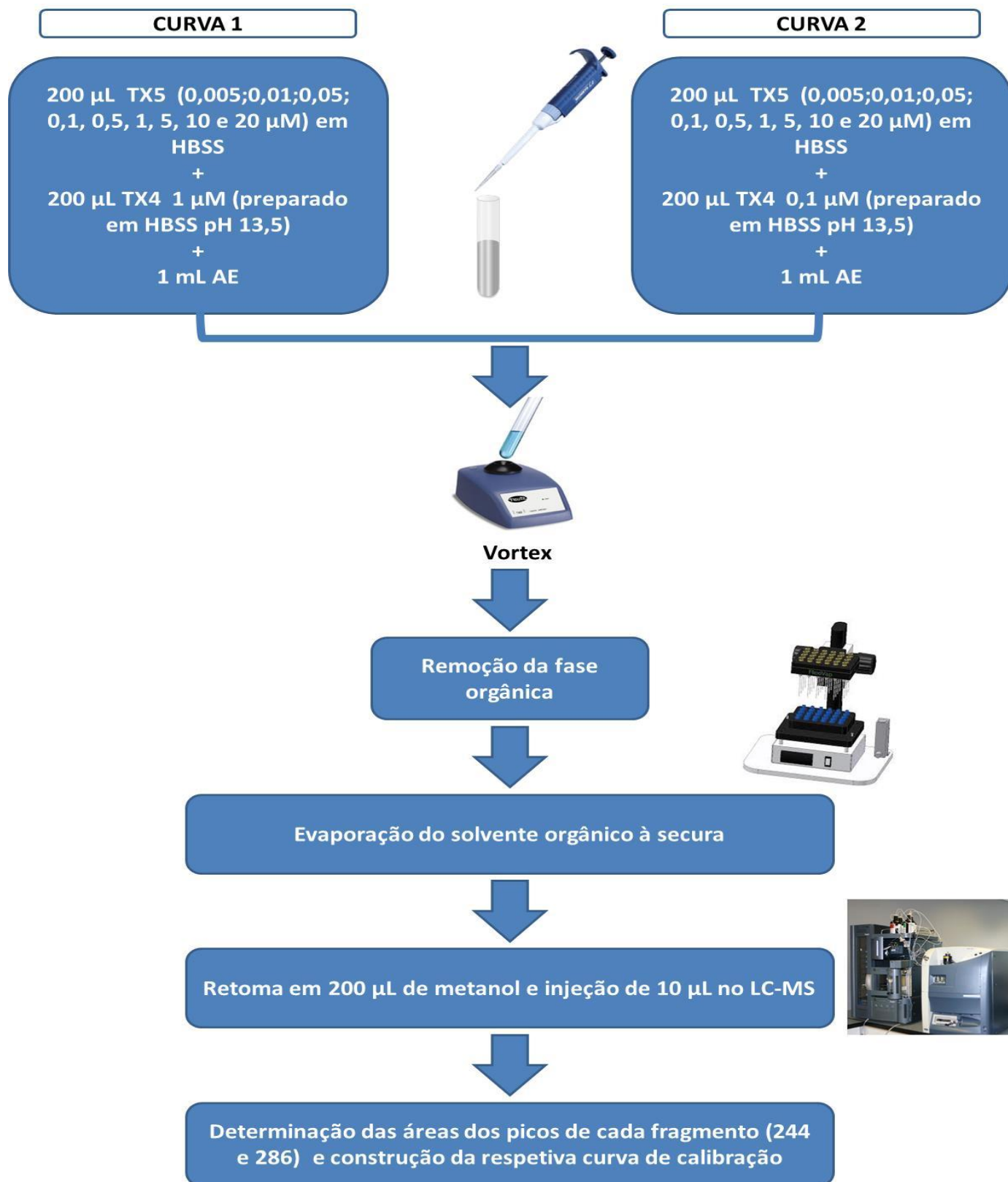
Procedimento laboratorial:

Figura 22 – Esquema do ensaio de linearidade.

Uma vez que se utilizou um PI, a proporcionalidade da intensidade do sinal analítico da TX5 [área do pico de cada um dos fragmentos maioritários (iões 244 e 286 (m/z)] em relação a uma determinada concentração de TX5 foi dada em termos de áreas relativas, que corresponde à razão da intensidade do sinal da TX5/intensidade do sinal do PI (TX5/TX4). Assim, foi efetuado um estudo de linearidade em que se procedeu à análise da correlação entre a concentração de TX5 e as seguintes razões de áreas de picos:

- $TX5_{286}/TX4_{286}$
- $TX5_{286}/TX4_{244}$
- $TX5_{244}/TX4_{286}$
- $TX5_{244}/TX4_{244}$

em que $TX5_{286}$ e $TX5_{244}$ corresponde à área dos picos dos fragmentos 286 e 244 (m/z) do TX5, respetivamente, e $TX4_{286}$ e $TX4_{244}$ corresponde à área dos picos dos fragmentos 286 e 244 (m/z) do TX4, respetivamente.

8.8. Análise Estatística

Todos os dados foram tratados usando o Software GraphPad 6.0 e o Microsoft Excell 2010. A integração e determinação das áreas dos picos cromatográficos foram efetuadas com o software Masslynx™ versão 4.1.

Parte IV

Resultados e discussão

9. Resultados e Discussão

9.1 Estudo da citotoxicidade da TX5 em células Caco-2 e RBE4 – Ensaio da redução do MTT e ensaio da incorporação do vermelho neutro

O objetivo deste ensaio foi avaliar a citotoxicidade da TX5 em células Caco-2 e RBE4, com o intuito de selecionar uma concentração não citotóxica a ser utilizada nos ensaios de avaliação da permeabilidade deste derivado tioxantónico através de monocamadas íntegras destas linhas celulares. Para o efeito, foram utilizados dois métodos distintos de avaliação da viabilidade celular: o ensaio de redução do MTT e o ensaio de incorporação do NR.

9.1.1 Células Caco-2

No caso das células Caco-2, os ensaios de avaliação da citotoxicidade da TX5 foram adaptados do trabalho desenvolvido por Silva et al. (2014) no qual se realizou o estudo da viabilidade celular através do ensaio de redução do MTT e do ensaio de incorporação do NR, na mesma linha celular, 24 horas após a exposição à TX5 em diferentes concentrações, 0,5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 50 μM e 100 μM (Silva, Sousa et al. 2014).

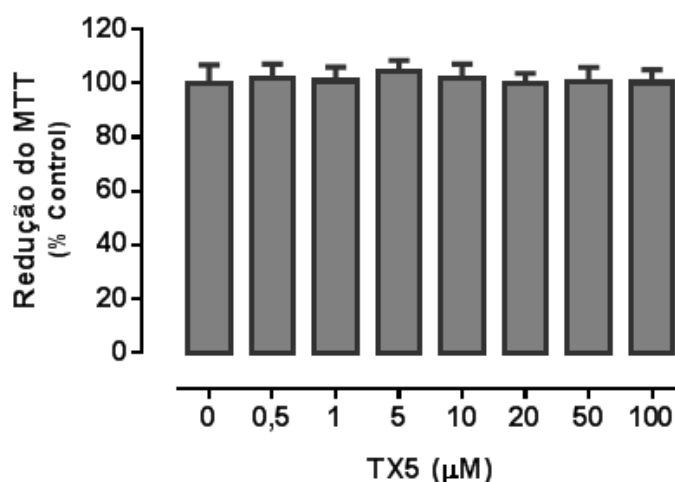


Figura 23 – Citotoxicidade da TX5 (0 – 100.0 μM) em células Caco-2, 24 h após exposição, avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados estão expressos como media \pm SD de 5 experiências independentes (realizadas em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test.

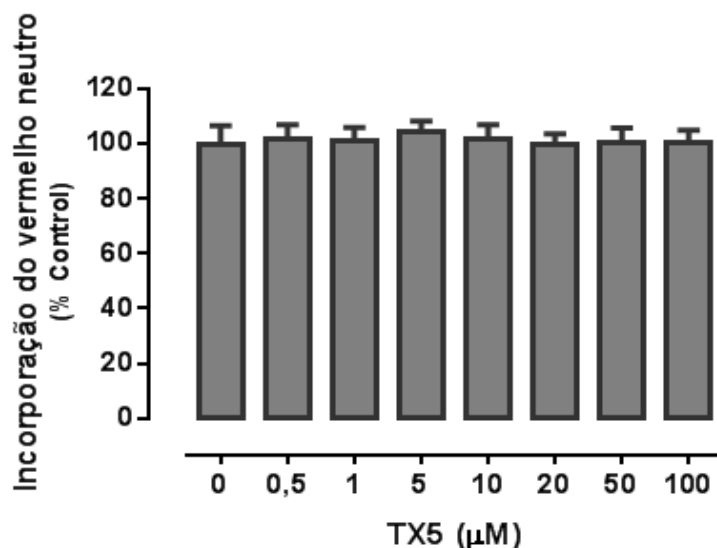


Figura 24 – Citotoxicidade da TX5 (0 – 100.0 µM) em células Caco-2, 24 h após exposição, avaliada pelo ensaio de incorporação do NR. Os resultados estão expressos como média \pm SD de 5 experiências independentes (realizadas em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test.

Como é possível verificar pelos gráficos acima representados, a TX5 nas concentrações testadas e após 24 h de exposição, não é citotóxica para as células Caco-2, dada a ausência de diferenças significativas de viabilidade celular relativamente às células controlo (TX5 0 µM). Apesar dos estudos de permeabilidade terem sido efetuados com exposição de monocamadas de células Caco-2 ao derivado tioxantónico durante um período de tempo de apenas 8 h, os resultados obtidos permitem aferir a ausência de toxicidade nesse intervalo de tempo, dada a ausência de citotoxicidade após exposição das células à TX5 por um período mais alargado de tempo, 24 h.

O efeito ativador/indutor da P-gp da TX5 em células Caco-2 foi previamente demonstrado por Silva et al. (2014) para a concentração de 20 µM (Silva, Sousa et al. 2014). De facto, nesse estudo, a TX5 (20 µM) causou um aumento significativo na expressão e atividade da P-gp em células Caco-2, 24 h após exposição, tal como avaliado por citometria de fluxo utilizando o anticorpo UIC2 e a rodamina 123, respetivamente (Silva, Sousa et al. 2014). Adicionalmente, este derivado tioxantónico demonstrou capacidade de causar uma rápida ativação da P-gp, quando presente apenas durante o efluxo de rodamina 123, atuando assim como rápido ativador da P-gp (Silva, Sousa et al. 2014). Tendo por base os resultados acima descritos e a ausência de citotoxicidade, selecionou-se a concentração de 20 µM como a concentração a usar nos estudos de permeabilidade.

9.1.2 Células RBE4

No caso das células RBE4, o estudo da avaliação da citotoxicidade da TX5 foi igualmente efetuado com recurso ao ensaio de redução do MTT e ao ensaio de incorporação do NR. Contudo, neste caso, as células RBE4 foram expostas ao TX5 apenas durante 8 horas, tempo de contacto previsto para os estudos de avaliação da permeabilidade deste composto. Neste estudo, foram apenas testadas duas concentrações de TX5 distintas, 10 e 20 μM , e um tempo de exposição, 8h. A seleção do tempo de exposição e das concentrações a serem testadas teve por base a duração dos estudos de permeabilidade e a definição da concentração de 20 μM como concentração a ser usada nesses mesmos estudos, concentração essa definida, tal como referido anteriormente, com base nos estudos descritos por Silva et al. (2014).

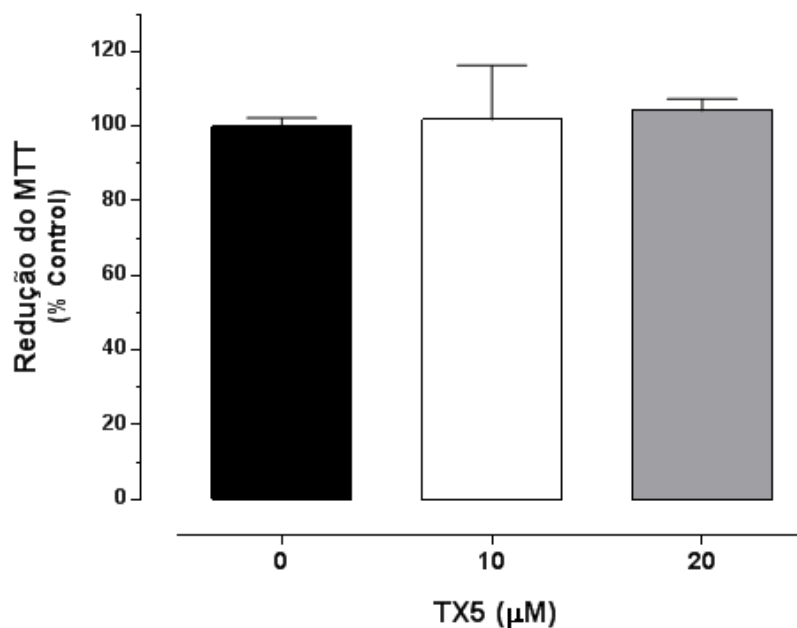


Figura 25 – Citotoxicidade do TX5 (0, 10 e 20 μM) em células RBE4, 8 h após exposição, avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados estão expressos como média \pm SD de 6 experiências independentes (realizadas em sextuplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test.

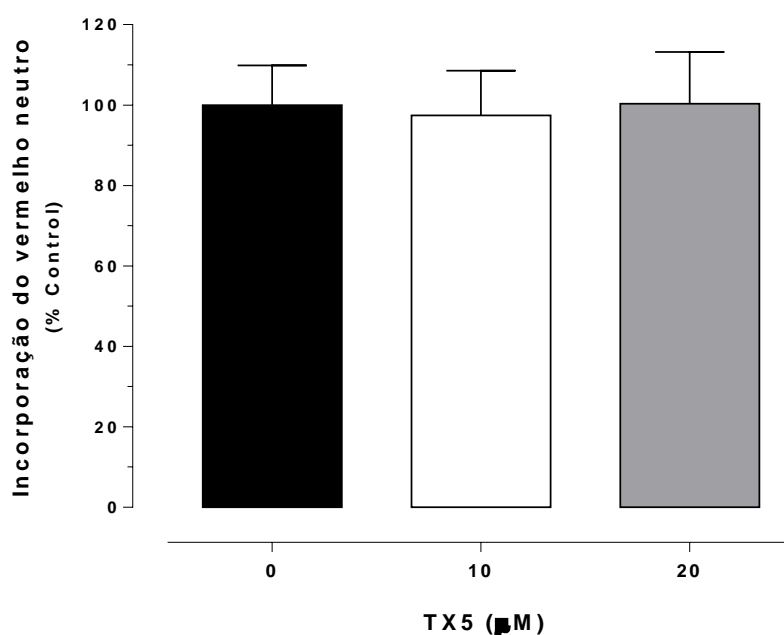


Figura 26 – Citotoxicidade do TX5 (0, 10 e 20 µM) em células RBE4, 8 h após exposição, avaliada pelo ensaio de incorporação do NR. Os resultados estão expressos como média \pm SD de 3 experiências independentes (realizadas em sextuplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test.

Tal como se pode verificar pela análise da **figura 25** e da **figura 26** a TX5, nas concentrações testadas e após 8 h de exposição, não apresenta citotoxicidade para as células RBE4, dada a ausência de diferenças significativas na viabilidade celular para as duas concentrações testadas relativamente às células controlo (TX5 0 µM).

Conclui-se então que a TX5 não é citotóxica na concentração de 20 µM quando em contacto com as células RBE4 durante 8 horas, podendo-se assim realizar os ensaios de permeabilidade. De acordo com a ausência de toxicidade, os ensaios de permeabilidade consistem na exposição das células Caco-2 e RBE4 à TX5 numa concentração de 20 µM por 8 horas, durante as quais são retiradas amostras da parte basal a diferentes tempos para verificar se o composto tem capacidade de atravessar a monocamada.

9.2 Desenvolvimento de uma metodologia para análise e quantificação da TX5

No presente trabalho experimental foi desenvolvida uma metodologia de LC-MS/MS para a análise e quantificação da TX5 nas amostras recolhidas nos estudos de permeabilidade. Para o efeito, vários parâmetros foram otimizados, tais como: a seleção e definição da concentração de padrão interno, a metodologia de extração do analito, a composição e o fluxo da fase móvel a ser utilizada no sistema de UPLC, o volume de injeção, a determinação dos tempos de retenção, assim como as condições de deteção no espectrómetro de massa (condições de ionização e de fragmentação). Tal como referido anteriormente, foi selecionada um tioxantona estruturalmente semelhante à TX5, a TX4, como padrão interno, tendo sido igualmente otimizadas as condições para a sua deteção no sistema de LC-MS/MS.

9.2.1 Otimização das condições cromatográficas e de deteção no detetor de massas

9.2.1.1 Otimização dos parâmetros de fragmentação - ajuste da voltagem do Cone e da Energia de Colisão por infusão direta

Numa primeira fase, procedeu-se ao ajuste das condições para a obtenção do ião precursor, ou seja o ião resultante da ionização do analito (ião molecular), para a obtenção dos respetivos iões produto [fragmentos da molécula original caracterizados pela sua razão massa/carga (m/z)]. Esse ajuste, envolveu a seleção inicial da voltagem do cone (C) e da energia de colisão (EC) por infusão direta de soluções metanólicas de TX5 e TX4 (10 μ M) no espectrómetro de massa, a um fluxo constante de 20 μ L/min. As restantes condições, como a voltagem do cone, foram inicialmente ajustadas de forma a permitir a visualização do pico do ião molecular com maior intensidade de sinal analítico, ou seja, maior área do pico detetado. Substâncias que apresentam grupos básicos, principalmente aminas, amidas e ésteres, são normalmente analisadas em modo positivo, dada a relativa facilidade com que as mesmas são protonadas. Deste modo, no presente trabalho, o equipamento foi operado no modo de ionização ESI+ (electrospray positivo) e, consequentemente, o ião molecular pesquisado foi o ião $[M+H]^+$, com uma razão massa/carga (m/z) de 328 e 342 para o TX5 e TX4, respetivamente. As condições de voltagem de cone variaram inicialmente entre 35 e 45 V (35, 40 e 45), tendo sido possível verificar, na monitorização em “tempo real” com infusão direta no espectrómetro de massa

de soluções metanólicas de TX5 e TX4 (10 μM) a um fluxo constante de 20 $\mu\text{L}/\text{nib}$, que a voltagem de cone que permitia a obtenção de um sinal analítico com maior intensidade para o ião molecular era a voltagem de 40 V, tanto para a TX5 como para a TX4 (**figura 27 e 28**)

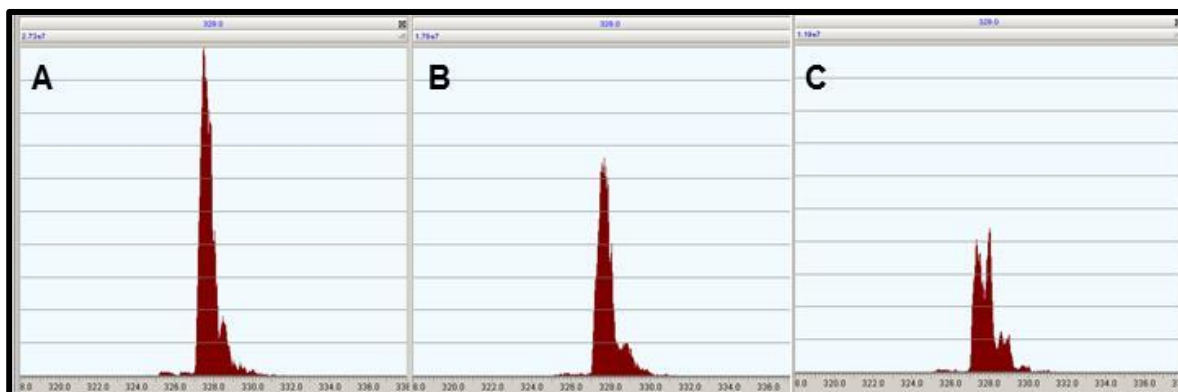


Figura 27 – Ilustração gráfica do ajuste e seleção da voltagem de cone que permitiu a obtenção de uma sinal analítico com maior intensidade para o ião molecular da TX5. Ião $[M+H]^+ = 328$ m/z. A – voltagem de cone: 40 V; B – voltagem de cone: 35 V; C – voltagem de cone: 45 V.



Figura 28 - Ilustração gráfica do ajuste e seleção da voltagem de cone que permitiu a obtenção de uma sinal analítico com maior intensidade para o ião molecular da TX4. Ião $[M+H]^+ = 342$ m/z. A – voltagem de cone: 40 V; B – voltagem de cone: 35 V; C – voltagem de cone: 45 V.

Após a seleção da voltagem de cone mais adequada à detecção do ião molecular, procedeu-se ao ajuste da energia de colisão, com o objetivo de otimizar as condições para a obtenção dos iões produto de cada ião molecular (328 e 342 m/z para a TX5 e TX4, respetivamente). Foram, assim, aplicados vários níveis de energia de colisão (22 - 28 eV) com o objetivo de analisar o comportamento de cada ião precursor, os quais são fragmentados por colisão com o árgon na célula de colisão, nos respetivos iões produto. Dos espectros resultantes são avaliados os vários fragmentos e seleccionados os iões produto com melhor resultado em termos de intensidade de sinal. Ou seja, por análise do espectro obtido, foram seleccionados os dois iões produto com maior intensidade de sinal para cada ião molecular analisado. Os iões produto que são então seleccionados possuem massa inferior ao seu ião precursor mas este também deve ser visível no espectro de massa. Assim, a energia de colisão deve ser suficiente para quebrar o ião precursor (ião molecular) nos seus fragmentos, mas ao mesmo tempo é importante permitir a visualização de aproximadamente 10% do próprio ião precursor. O varrimento inicial foi efetuado para valores de 25 a 500 m/z, mas dada a ausência de iões produto com intensidade de sinal elevada para valores de m/z inferiores a 200, o varrimento foi depois efetuado de 200 a 500 m/z (**figura 29**).

Tal como se pode observar pela análise da **figura 29**, a fragmentação do ião molecular da TX5 (328 m/z) origina dois iões produto maioritários (mais intensidade de sinal): iões produto 244 e 286 (m/z). O ião produto 286 m/z corresponde à fragmentação do ião molecular com perda do fragmento F1, enquanto o ião produto 244 m/z corresponde à fragmentação do ião molecular com perda do fragmento F1 e F2 (**figura 30**). A análise dos espectros obtidos com diferentes energias de colisão permite igualmente verificar que com uma EC de 25 eV é possível visualizar os dois iões produto maioritários, assim como aproximadamente 10% do ião precursor. O aumento da EC para 27 eV causa a fragmentação da totalidade do ião precursor, enquanto uma EC de 22 eV permite a visualização de uma quantidade superior a 10% de ião precursor. Deste modo, foi fixada a EC de 25 eV como a EC mais adequada a prosseguir os estudos.

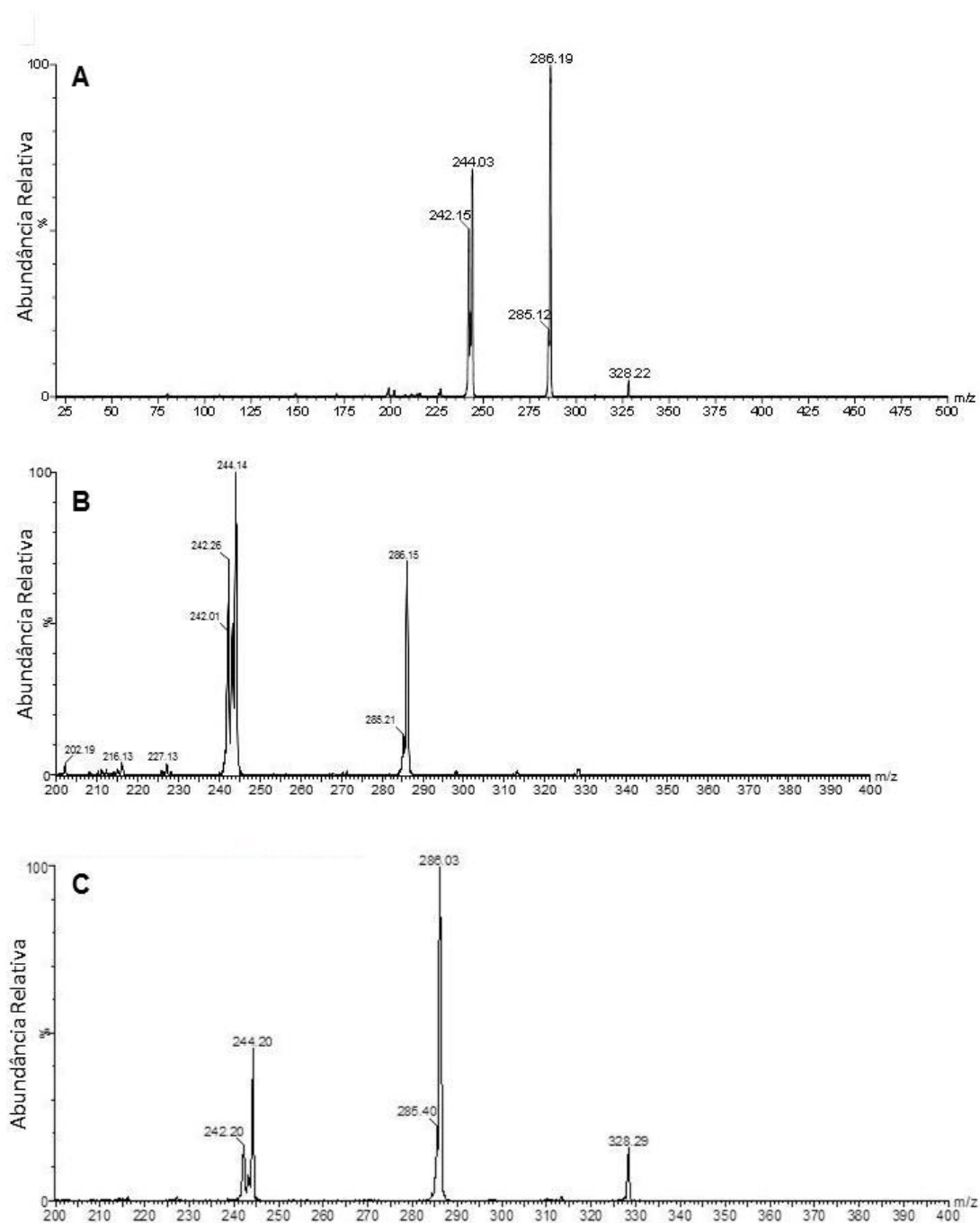


Figura 29 – Espetro de massas da TX5 obtido por infusão direta de 10 μM de TX5 (20 μL/min). O espectro foi obtido com uma voltagem de cone de 40 V e com uma energia de colisão A: 25 eV, B: 27 eV, C: 22 eV. É possível visualizar dois íões produto maioritários da TX5, os íões 244 e 286 (m/z), assim como o íão precursor [íão 328 (m/z)].

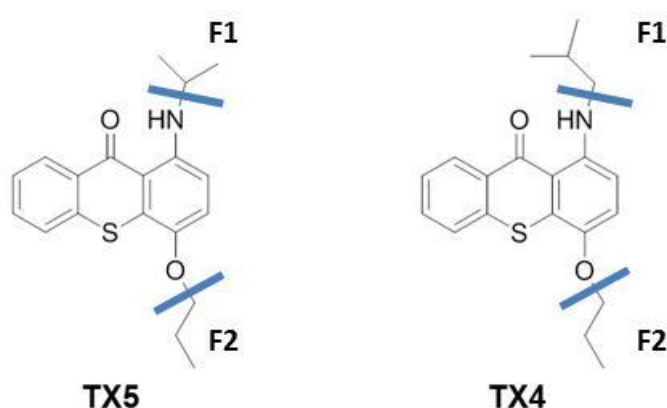


Figura 30 – Locais de fragmentação principais da TX5 e da TX4

No que respeita à TX4, a fragmentação do ião molecular (342 m/z) origina igualmente dois iões produto maioritários (mais intensidade de sinal), e com a mesma razão m/z que os iões produto da TX5: os iões produto 244 e 286 (m/z). O ião produto 286 m/z corresponde à fragmentação do ião molecular com perda do fragmento F1, enquanto o ião produto 244 m/z corresponde à fragmentação do ião molecular com perda do fragmento F1 e F2 (**figura 30**). A análise dos espetros obtidos com diferentes energias de colisão permite verificar que a EC mais adequada a prosseguir os estudos é a de 27 eV, garantindo a visualização de aproximadamente 10% do ião precursor (**figura 31**).

Tal como referido anteriormente, a otimização acima referida foi efetuada por infusão direta no espetrómetro de massas e, posteriormente, foi necessário aperfeiçoar a otimização desses parâmetros no sistema completo de LC-MS/MS, com a injeção (10 µL) dos compostos no HPLC na concentração de 10 µM, nas condições analíticas pretendidas, e após a seleção da fase móvel mais adequada.

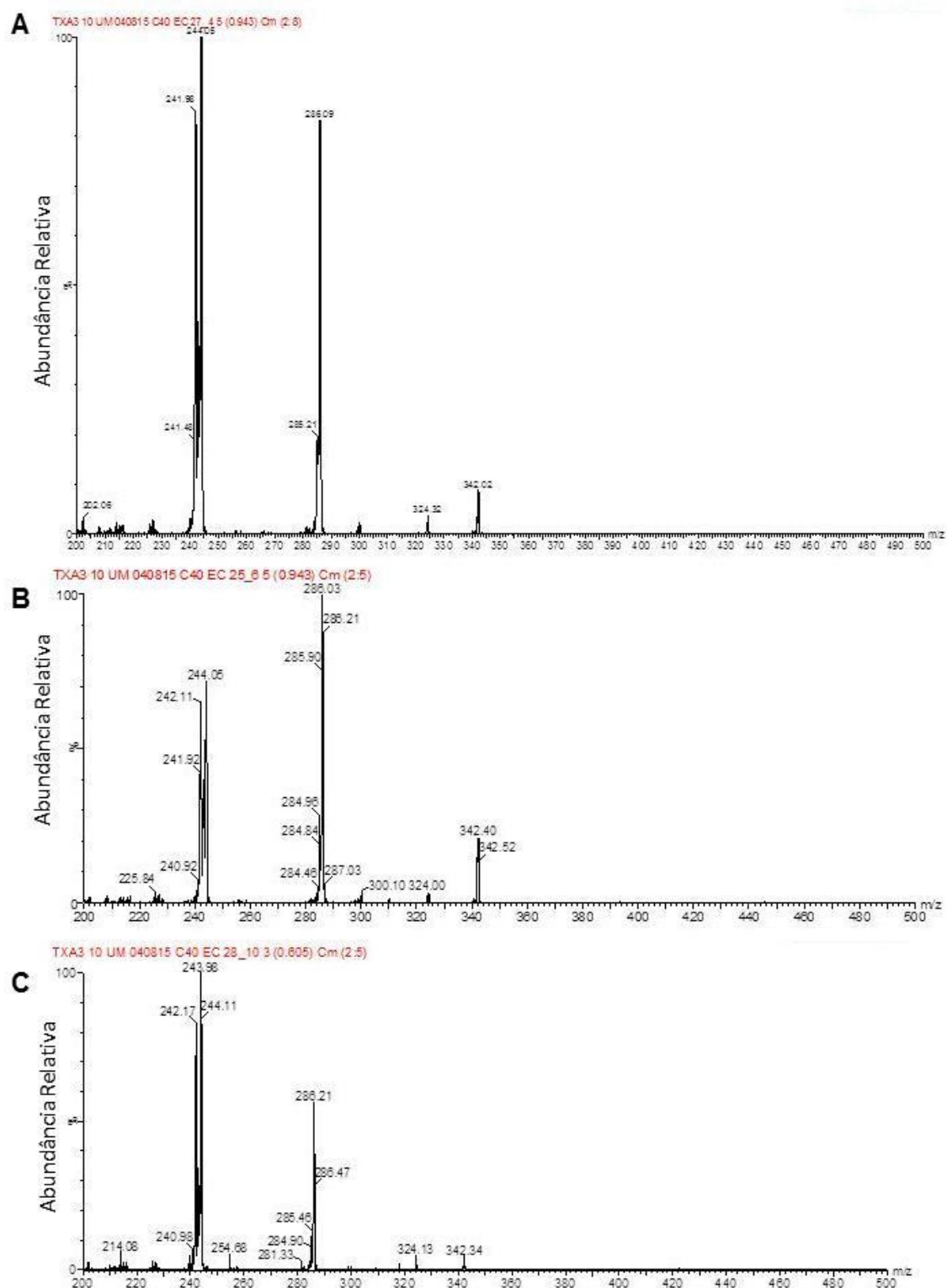


Figura 31 – Espetro de massas da TX4 obtido por infusão direta de 10uM de TX4 (20 μ L/min). O espectro foi obtido com uma voltagem de cone de 40 V e com uma energia de colisão A: 27 eV, B: 25 eV, C: 28 eV. É possível visualizar dois íons produto maioritários da TX5, os íons 244 e 286 (m/z), assim como o íon precursor [íon 342 (m/z)].

9.2.1.2 Ajuste da composição e fluxo da fase móvel

Após a otimização das condições de obtenção do ião molecular e dos correspondentes iões produto procedeu-se à otimização das condições cromatográficas no sistema de LC-MS/MS completo, nomeadamente a composição da fase móvel e o respetivo fluxo. O objetivo desta otimização foi a obtenção de picos da TX4 e TX5 com elevada resolução, e com eficiente separação dos dois compostos num curto intervalo de tempo de corrida. O equipamento foi operado novamente no modo de ionização ESI+ (electrospray positivo) e no modo MRM (*multiple reaction monitoring*), tendo sido selecionados, para cada composto, os dois iões produto com melhor intensidade de sinal, ou seja, foram analisados, para cada derivado tioxantónico, as duas transições que resultam nos dois iões produtos de maior intensidade de sinal. Assim, com a voltagem de cone e energia de colisão definidas na **secção 9.2.1.1**, foram avaliadas em modo MRM as seguintes transições (m/z):

- 328 > 244
- 328 > 286
- 342 > 244
- 342 > 286

Com base em estudos anteriores efetuados no Laboratório de Toxicologia, a fase móvel inicialmente testada era constituída por 10% de solvente A (água) + 90% de solvente B (metanol), aos quais foi posteriormente adicionado acetato de amónio 5 mM, com o objetivo de garantir uma boa ionização de ambos os compostos. O sistema foi operado em modo isocrático, tendo sido inicialmente configurado um fluxo de 0.3 mL/min e um volume de injeção de 10 µL. Pela análise da (**figura 32**) é possível verificar que os picos cromatográficos obtidos apresentam uma elevada resolução, com a TX5 e a TX4 a apresentarem um tempo de retenção (TR) de 22,07 e 33,24 minutos, respetivamente. Contudo, nestas condições cromatográficas é necessário um elevado tempo de corrida (~40 min) para a separação e deteção dos compostos em estudo. Foi, assim, alterada a percentagem de solvente orgânico na fase móvel para 95 % (solvente B) e novamente injectados, isoladamente, os dois derivados tioxantónicos na concentração de 10 µM. Nestas condições cromatográficas foi igualmente possível a obtenção de picos com uma excelente resolução e num período de tempo de corrida mais reduzido, com a alteração dos tempos de retenção da TX5 e da TX4 para 12,60 e 17,58 minutos, respetivamente (**figura 33**).

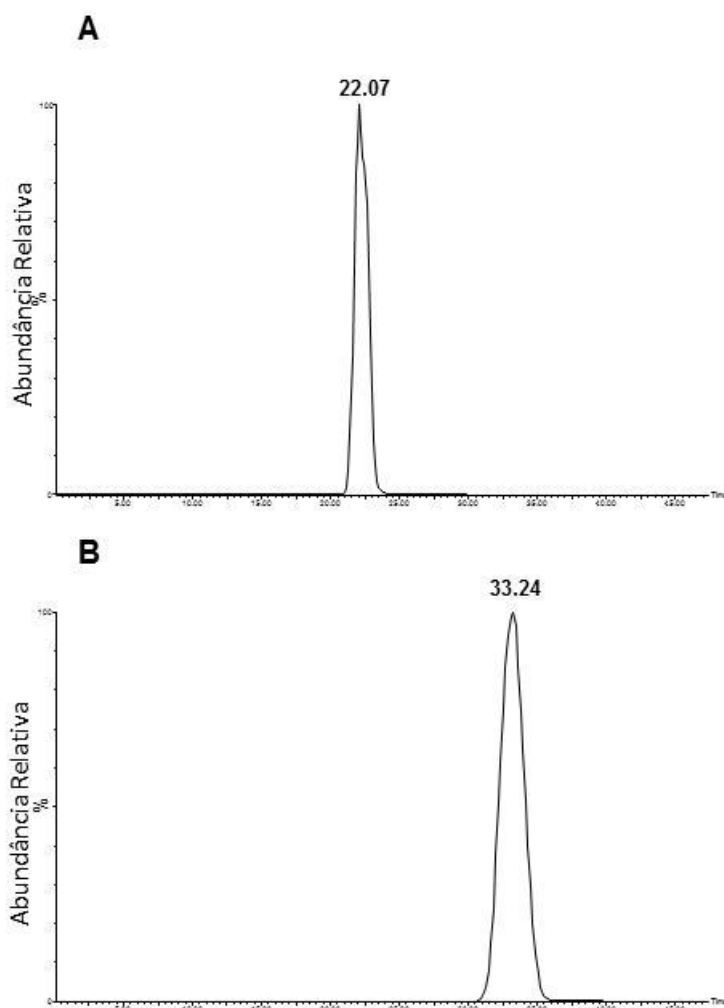


Figura 32 – Cromatograma obtido após injeção no LC-MS/MS de 10 μ L de TX5 10 μ M (A) e 10 μ L de TX4 10 μ M (B), utilizando uma fase móvel constituída por 10% de solvente A (água) + 90% de solvente B (metanol), com acetato de amônio 5 mM, a um fluxo de 0,3 mL/min. Os cromatogramas estão ilustrados em modo TIC (*total ion current*), representando a soma da intensidade das massas a serem detetadas, ou seja, a soma da intensidade dos sinais analíticos dos iões produto 244 e 286 (m/z).

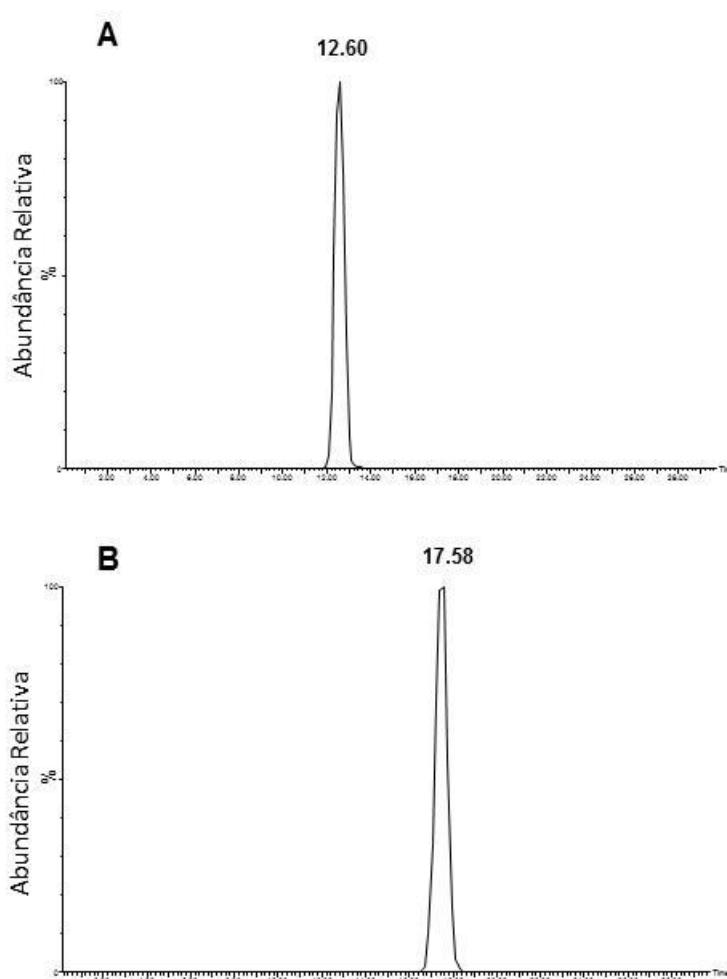


Figura 33 – Cromatograma obtido após injeção no LC-MS/MS de 10 μ L de TX5 10 μ M (A) e 10 μ L de TX4 10 μ M (B), utilizando uma fase móvel constituída por 5 % de solvente A (água) + 95 % de solvente B (metanol), com acetato de amónio 5 mM, a um fluxo de 0,3 mL/min. Os cromatogramas estão ilustrados em modo TIC (*total ion current*), representando a soma da intensidade das massas a serem detetadas, ou seja, a soma da intensidade dos sinais analíticos dos iões produto 244 e 286 (m/z).

Foi posteriormente testada a fase móvel anterior (5% de água + 95% de metanol) mas alterado o fluxo de 0,3 para 0,4 ml/min, permitindo igualmente a obtenção de picos com elevada resolução, mas com uma redução significativa do tempo de corrida (**figura 34**). Procedeu-se, então à injeção simultânea de TX4 e TX5 na concentração de 5 μ M (10 μ L de volume de injeção) nas condições cromatográficas acima referidas, verificando-se igualmente uma elevada resolução dos picos cromatográficos, sendo possível a sua eficiente separação e num tempo de corrida inferior a 15 minutos. Nestas condições cromatográficas, a TX5 e a TX4 apresentam um tempo de retenção de 9,58 e 13,04 minutos, respetivamente.

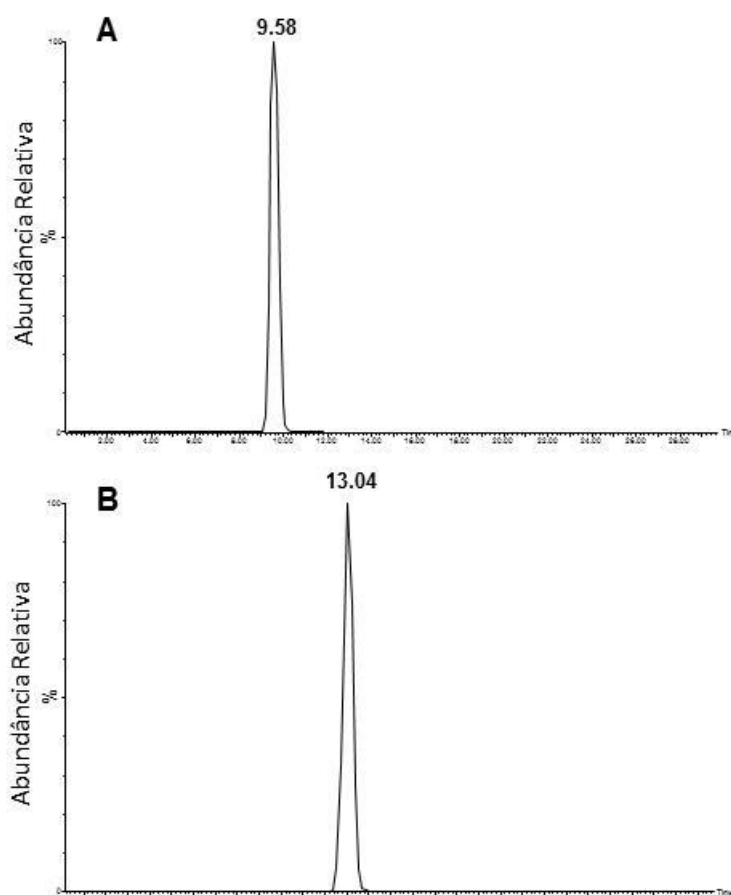


Figura 34 – Cromatograma obtido após injeção no LC-MS/MS de 10 μ L de TX5 10 μ M (A) e 10 μ L de TX4 10 μ M (B), utilizando uma fase móvel constituída por 5 % de solvente A (água) + 95 % de solvente B (metanol), com acetato de amónio 5 mM, a um fluxo de 0,4 mL/min. Os cromatogramas estão ilustrados em modo TIC (*total ion current*), representando a soma da intensidade das massas a serem detetadas, ou seja, a soma da intensidade dos sinais analíticos dos iões produto 244 e 286 (m/z).

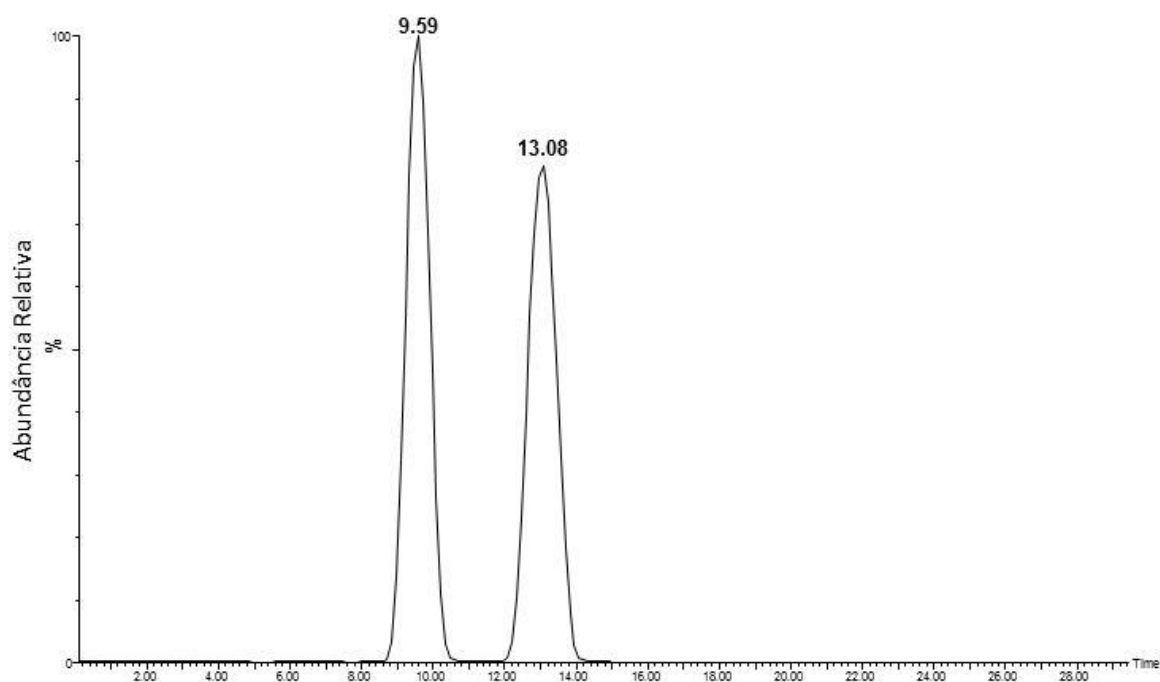


Figura 35 – Cromatograma obtido após injeção no LC-MS/MS de 10 μ L de uma mistura de TX5 e TX4 na concentração de 5 μ M, utilizando uma fase móvel constituída por 5 % de solvente A (água) + 95 % de solvente B (metanol), com acetato de amônio 5 mM, a um fluxo de 0,4 mL/min. Os cromatogramas estão ilustrados em modo TIC (*total ion current*), representando a soma da intensidade das massas a serem detetadas, ou seja, a soma da intensidade dos sinais analíticos dos iões produto 244 e 286 (m/z) de cada ião precursor.

As condições de otimização foram posteriormente ajustadas para cada composto, de forma independente para os dois fragmentos maioritários de cada composto, com o objetivo de obter-se a maior intensidade de sinal no detetor. No entanto, como já referido anteriormente, esta otimização da voltagem do cone de colisão e da energia de colisão para cada um dos fragmentos não é feita através da infusão direta no MS, mas sim no LC acoplado ao MS.

9.2.1.3 Otimização das condições de fragmentação e deteção da TX5 no sistema completo de LC-MS/MS

Tal como referido anteriormente, a otimização referida na **secção 9.2.1.1** foi efetuada por infusão direta no espetrómetro de massas de soluções metanólicas de TX5 e TX4 (10 μ M) a um fluxo de 20 μ L/min. Após a otimização das condições cromatográficas em termos de composição da fase móvel e respetivo fluxo, foi necessário aperfeiçoar a otimização da voltagem de cone e da energia de colisão no sistema completo de LC-MS/MS. Para o efeito procedeu-se à injeção (10 μ L) das mesmas soluções metanólicas dos derivados tioxantónicos (na concentração de 10 μ M), nas condições analíticas pretendidas, e após a seleção da fase móvel mais adequada. Tal como referido anteriormente, o equipamento foi operado no modo de ionização ESI+ (electrospray positivo) e no modo MRM (*multiple reaction monitoring*). Para o efeito, fixou-se a energia de colisão definida previamente por infusão direta (25 e 27 eV para o TX5 e TX4, respetivamente) e determinou-se a voltagem de cone que permitia a obtenção de um sinal analítico com maior intensidade para cada um dos fragmentos maioritários da TX5 e da TX4 (244 e 286 m/z). Foram assim criadas múltiplas funções MRM em que, para cada composto, se fez variar o valor de voltagem do cone em +2, -2, +5, -5, +10 e -10 V relativamente ao valor de 40V fixado anteriormente.

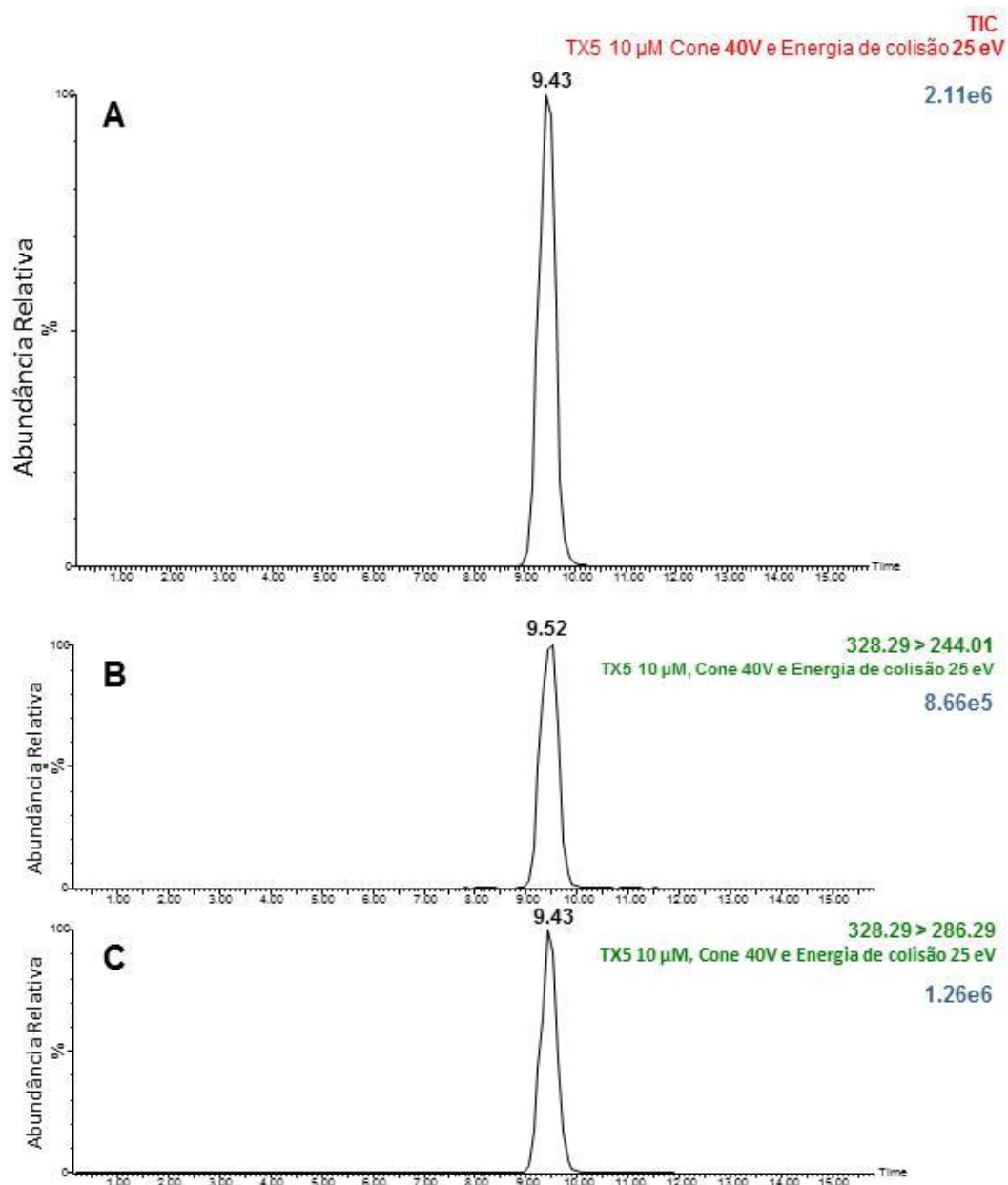


Figura 36 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 μM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 40 V e com uma energia de colisão 25 eV. A – Cromatograma obtido em modo TIC (sinal analítico corresponde à soma dos sinais detetados para os fragmentos 244 e 286 m/z da TX5. B – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 8,66e5). C – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,26e6).

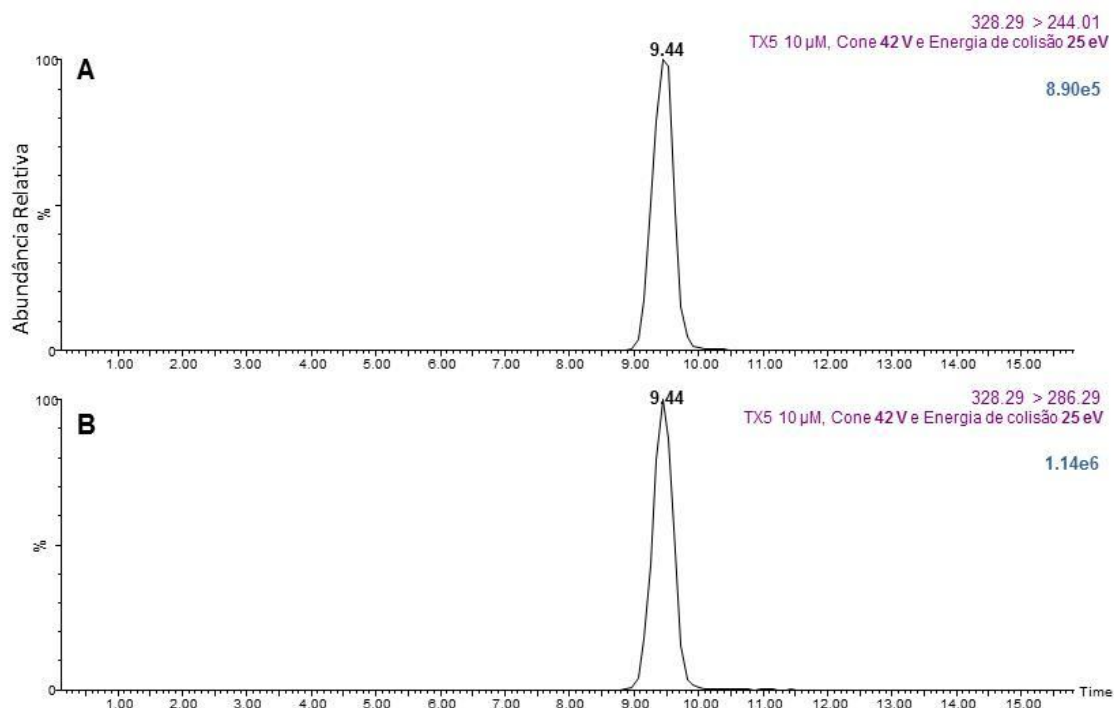


Figura 37 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **42 V** e com uma energia de colisão **25 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 8,90e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,14e6).

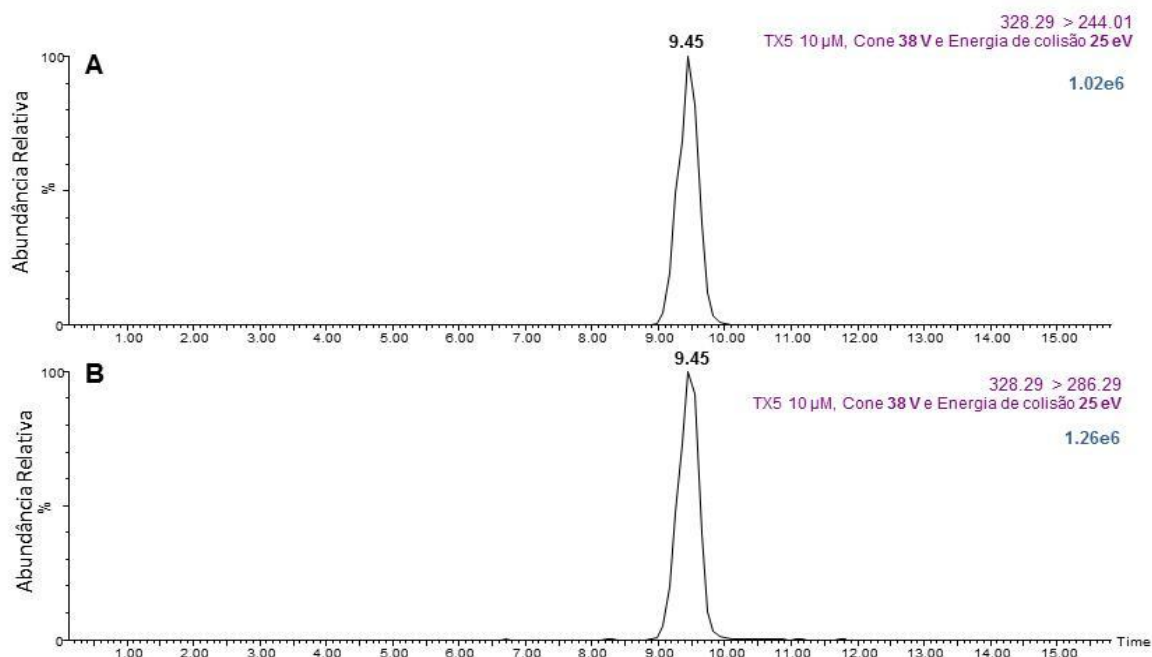


Figura 38 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **38 V** e com uma energia de colisão **25 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,02e6). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,26e6).

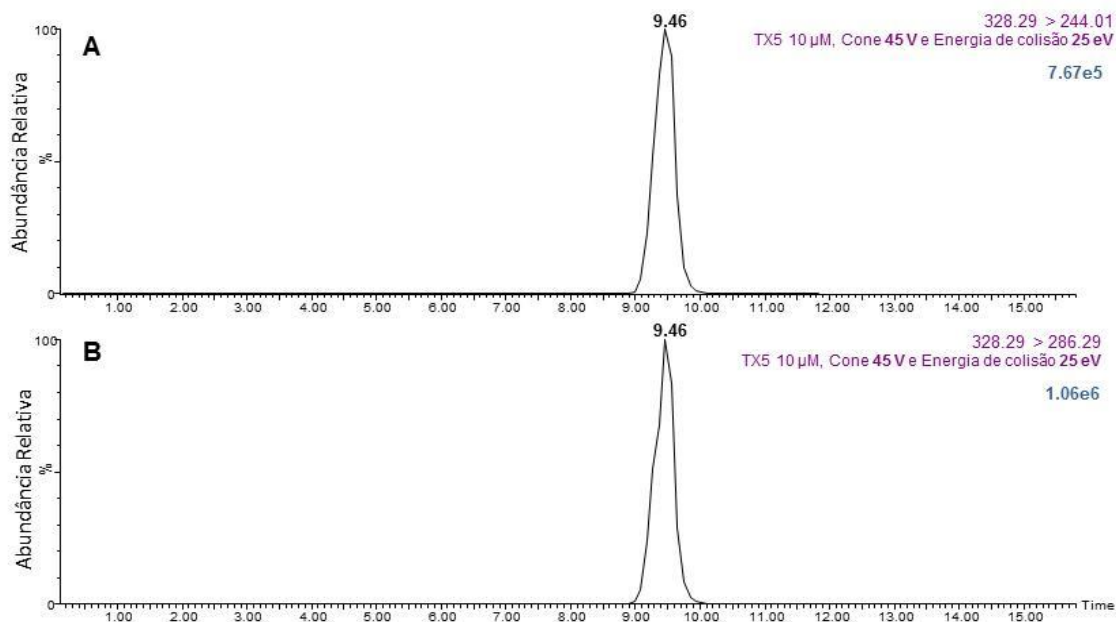


Figura 39 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **45 V** e com uma energia de colisão **25 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 7,67e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,06e6).

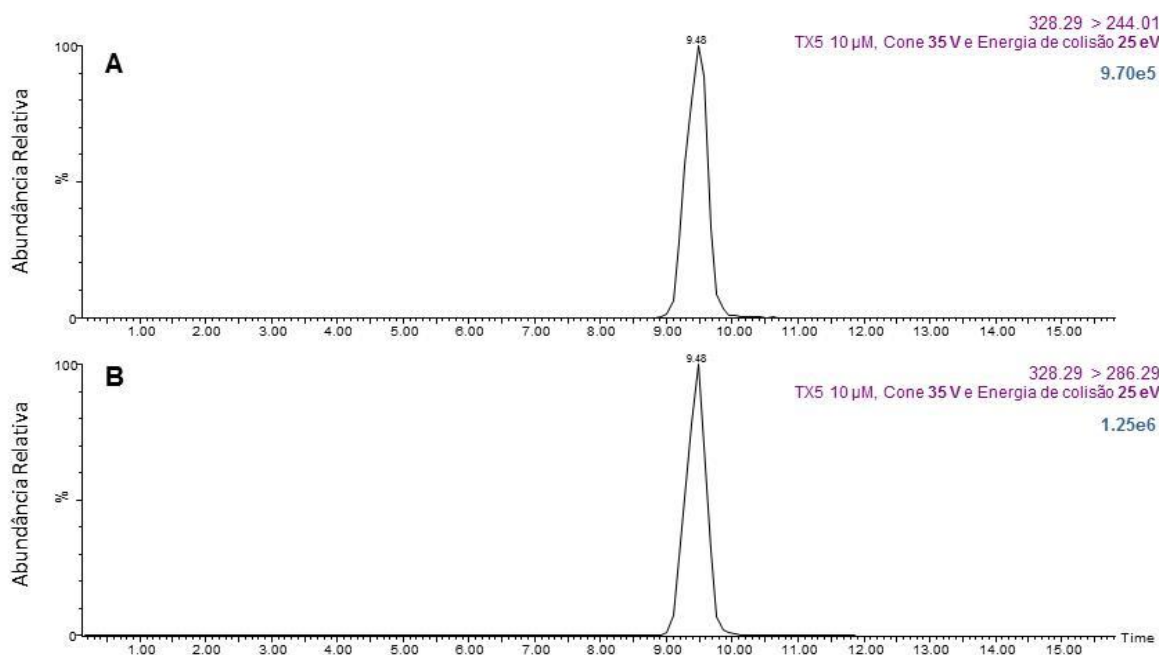


Figura 40 - Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **35 V** e com uma energia de colisão **25 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 9,70e5). B- Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,25e6).

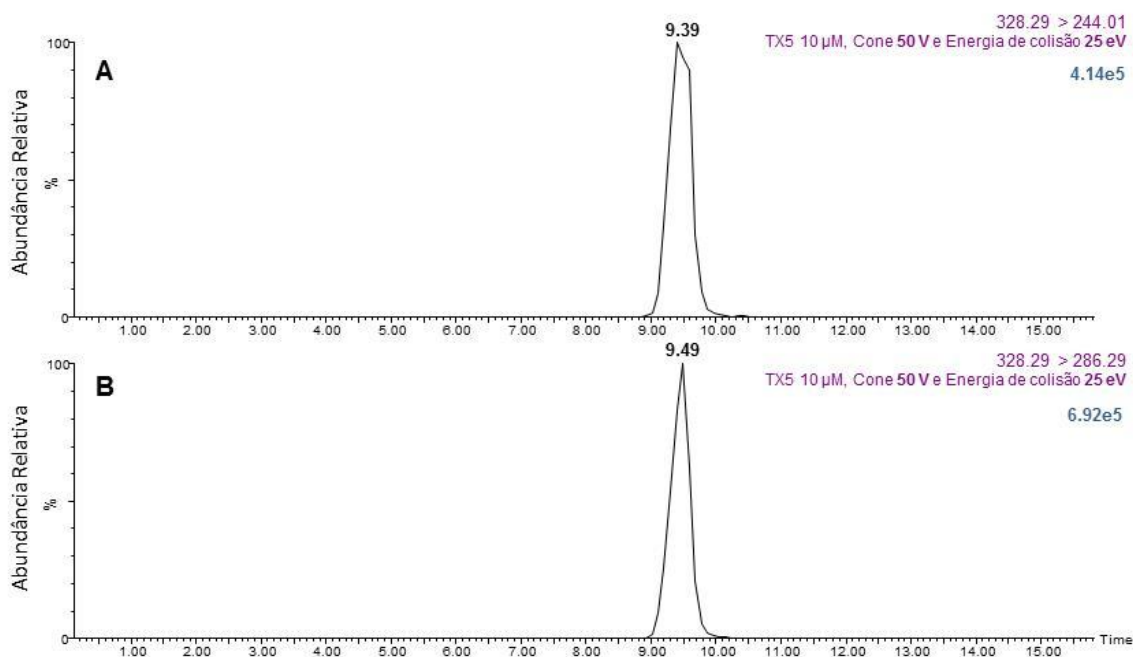


Figura 41 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **50 V** e com uma energia de colisão **25 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 4,14e5). B- Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 6,92e5).

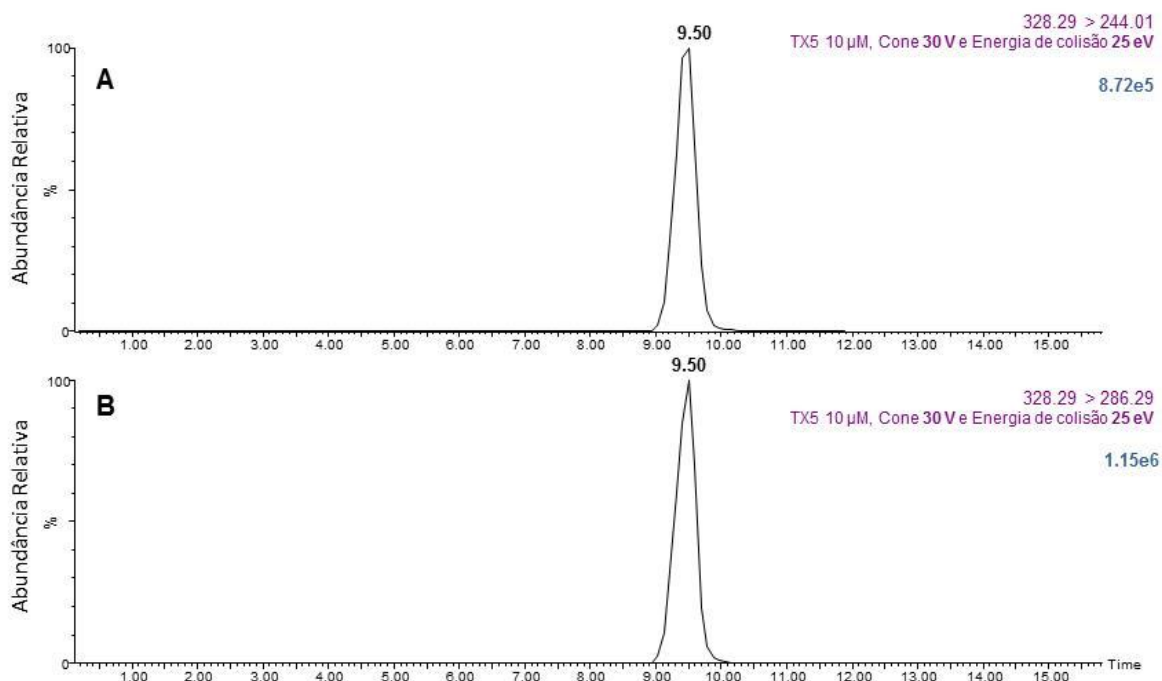


Figura 42 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **30 V** e com uma energia de colisão **25 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 8,72e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,15e6).

Pela análise dos cromatogramas anteriores foi possível verificar que o sinal analítico de maior intensidade para o fragmento 244 m/z da TX5 foi obtido com uma voltagem de cone de 38 V (**figura 38**), enquanto o sinal analítico mais intenso para o fragmento 286 m/z foi obtido com uma voltagem de cone de 38 V ou 40 V (**figura 36**). Sendo assim, definiu-se a voltagem de cone de 38 V como a voltagem de trabalho uma vez que se consegue obter uma maior intensidade de sinal para os dois fragmentos principais da TX5.

Uma vez fixada a voltagem de cone procedeu-se à seleção da energia de colisão que permite a obtenção de um sinal analítico com maior intensidade para cada um dos fragmentos maioritários da TX5. Assim, fez-se variar a energia de colisão previamente definida por infusão direta no espectrómetro de massas - 25 eV – em +2, -2, +5, -5, +10 e -10 eV, mantendo uma voltagem de cone de 38 V.

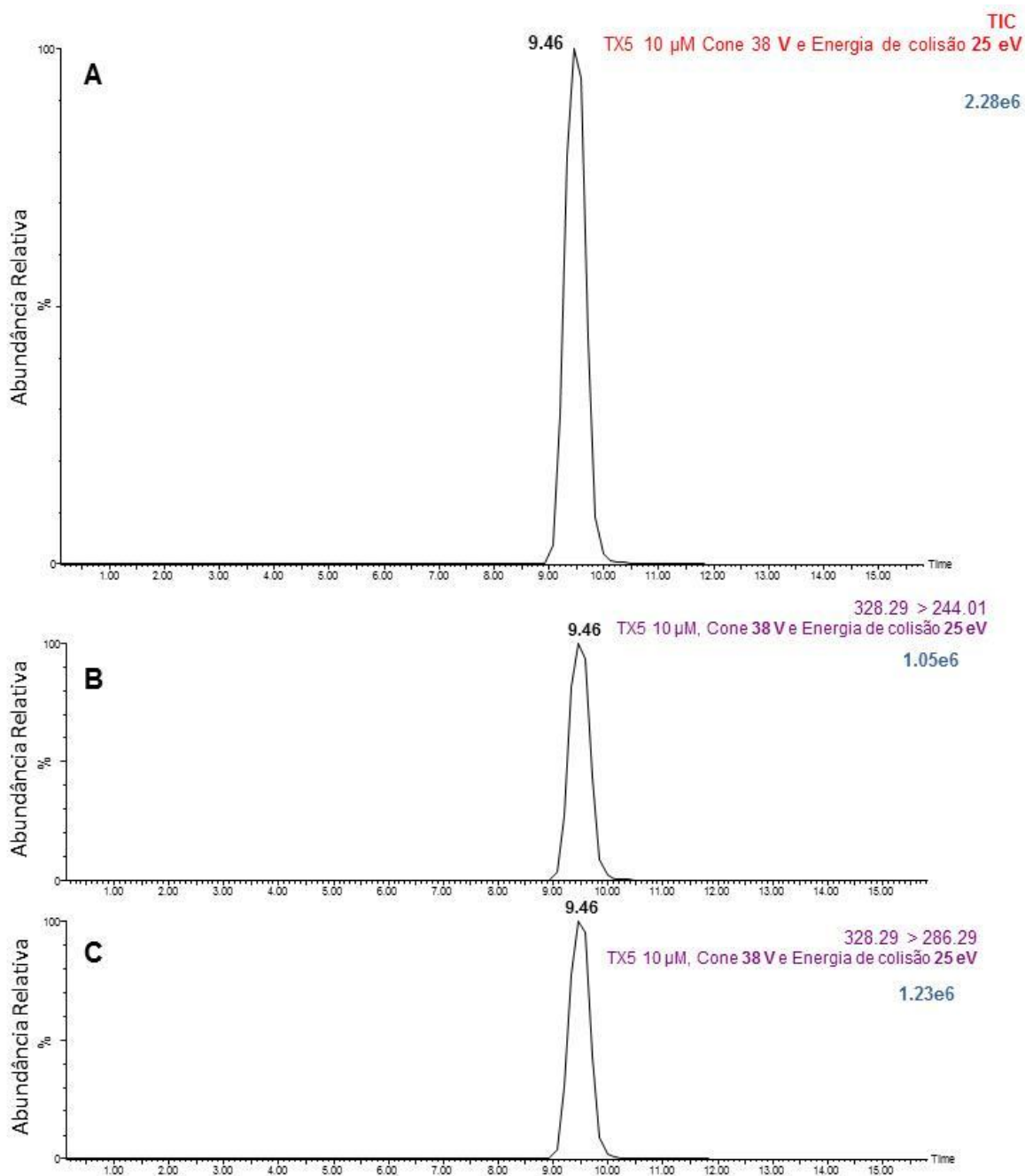


Figura 43 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de 38 V e com uma energia de colisão 25 eV. A – Cromatograma obtido em modo TIC (sinal analítico corresponde à soma dos sinais detetados para os fragmentos 244 e 286 m/z da TX5. B – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,05e6). C — Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,23e6).

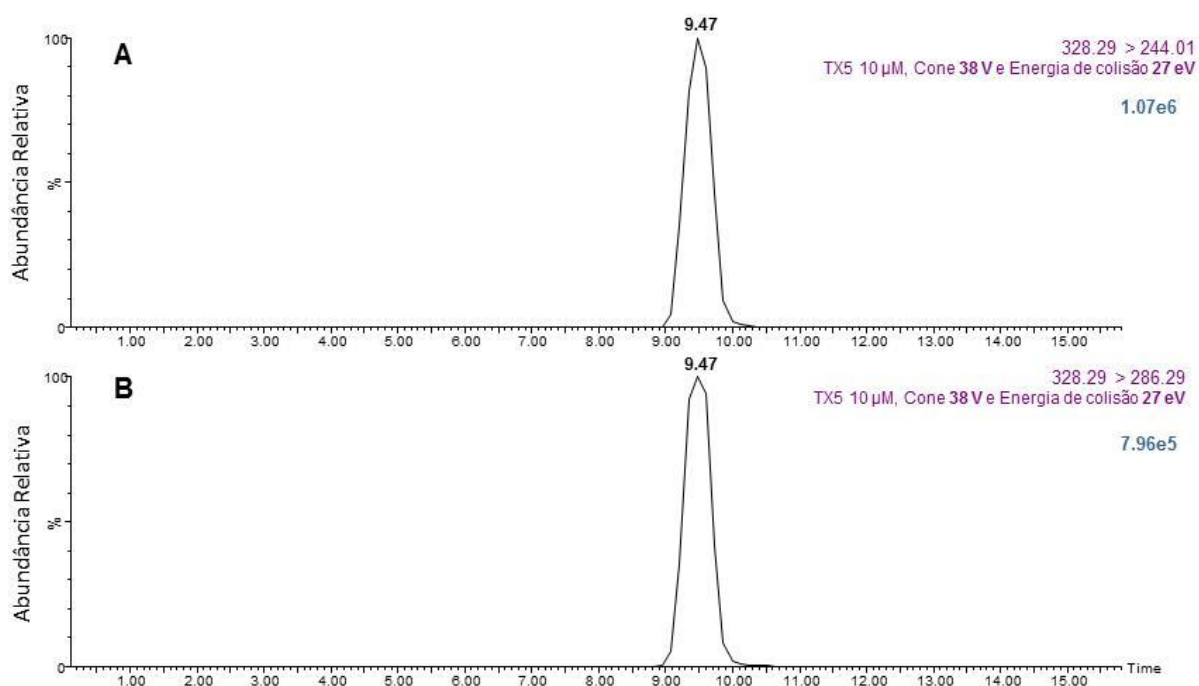


Figura 44 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **38 V** e com uma energia de colisão **27 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,07e6). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 7,96e5).

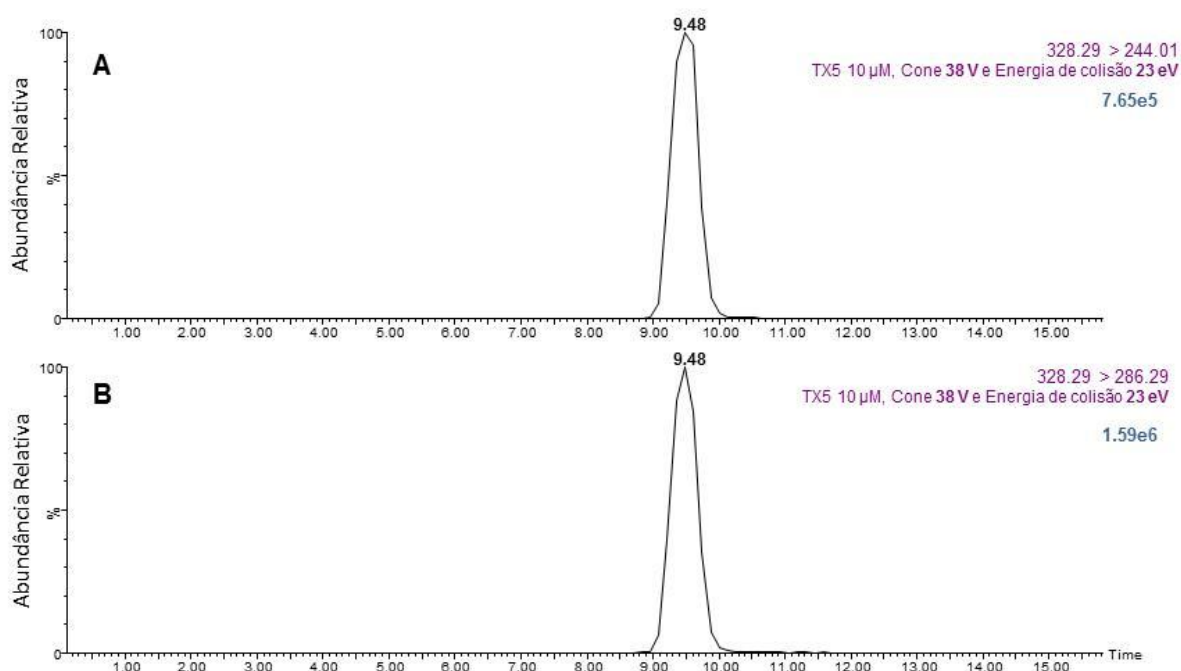


Figura 45 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **38 V** e com uma energia de colisão **23 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 7,65e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,59e6).

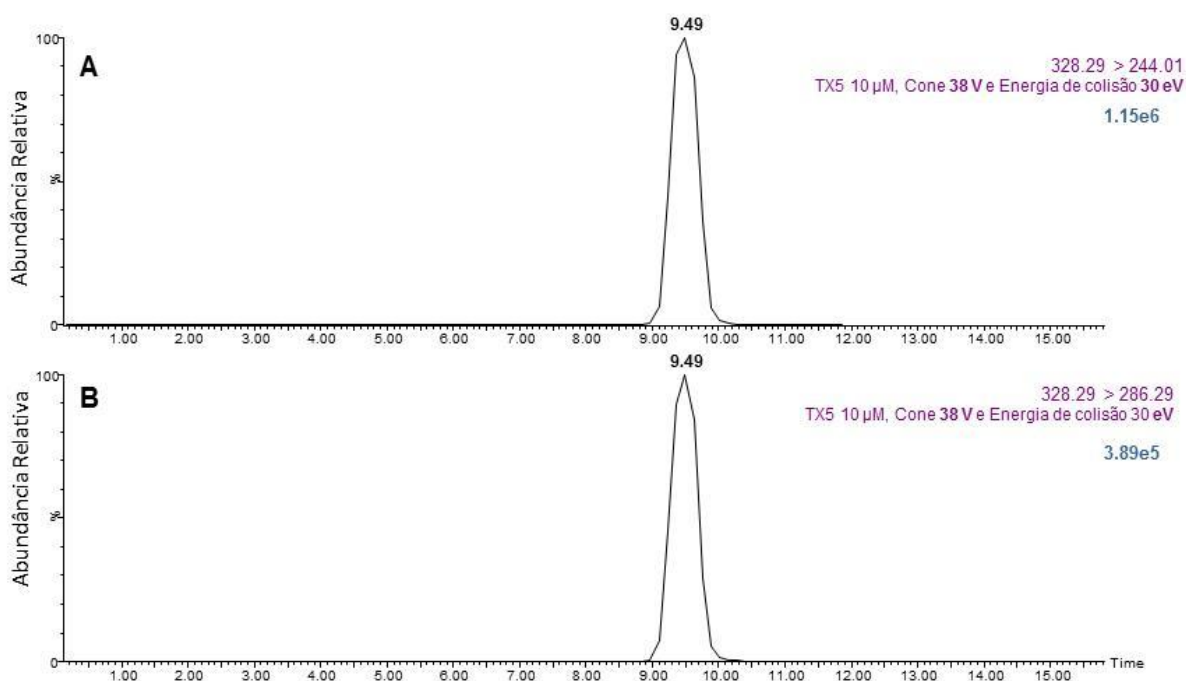


Figura 46 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **38 V** e com uma energia de colisão **30 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,15e6). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 3,89e5).

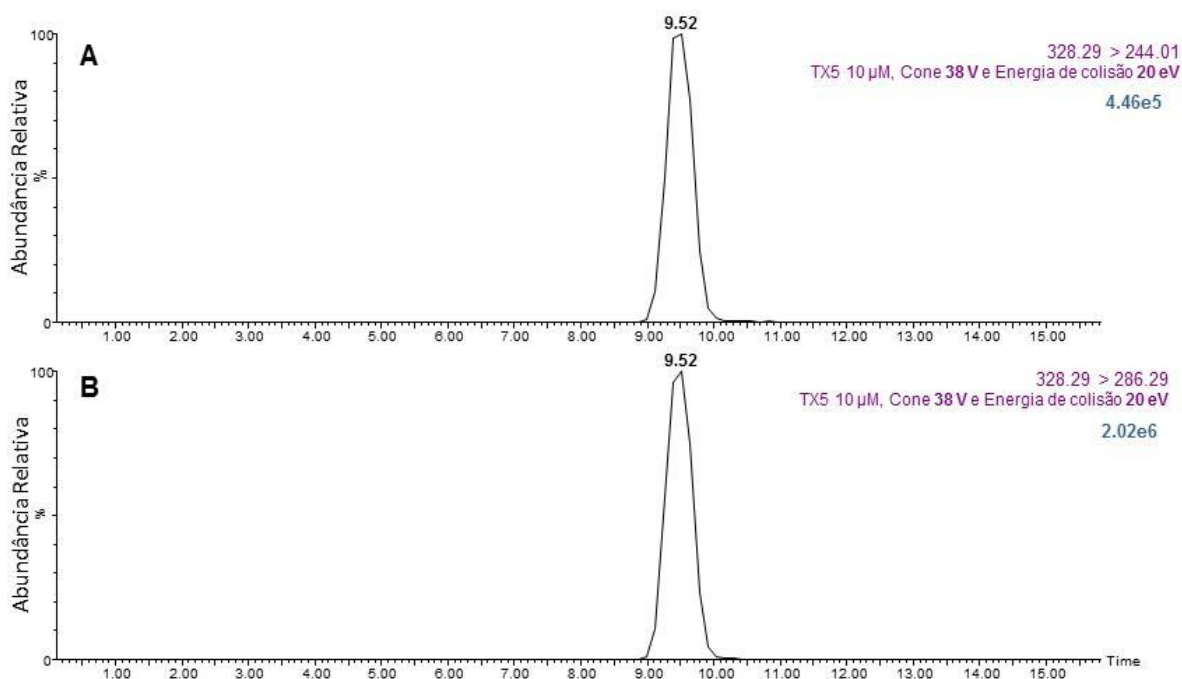


Figura 47 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **38 V** e com uma energia de colisão **20 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 4,46e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 2,02e6).

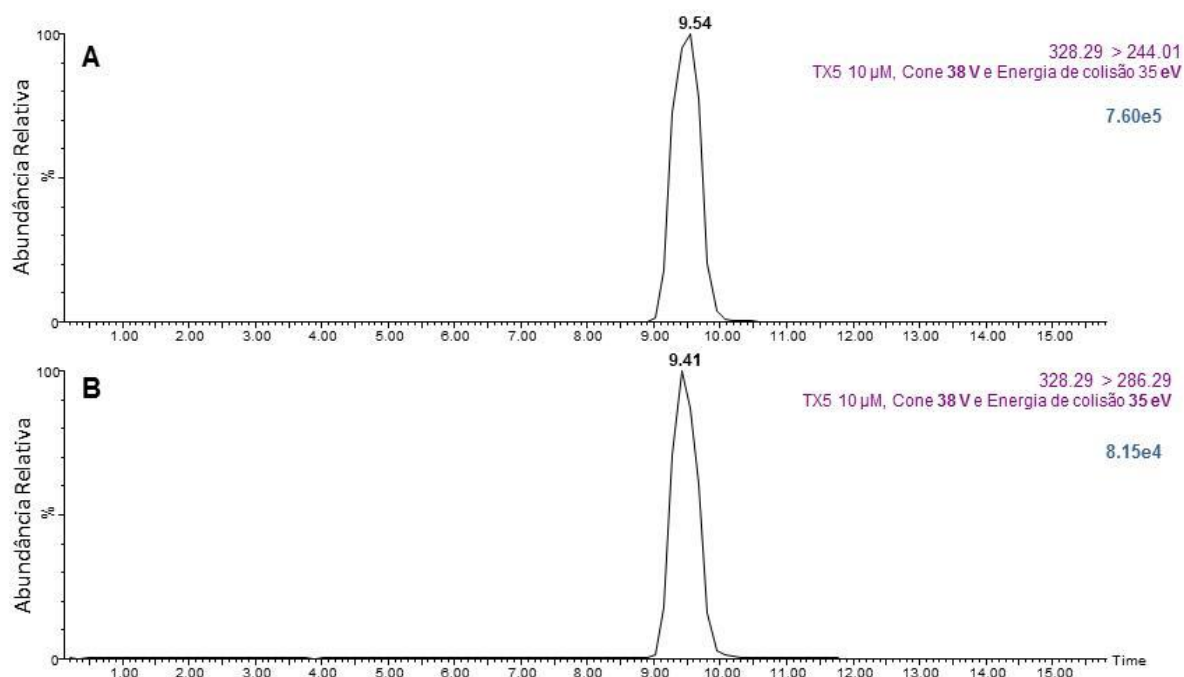


Figura 48 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **38 V** e com uma energia de colisão **35 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 7,60e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 8,15e4)

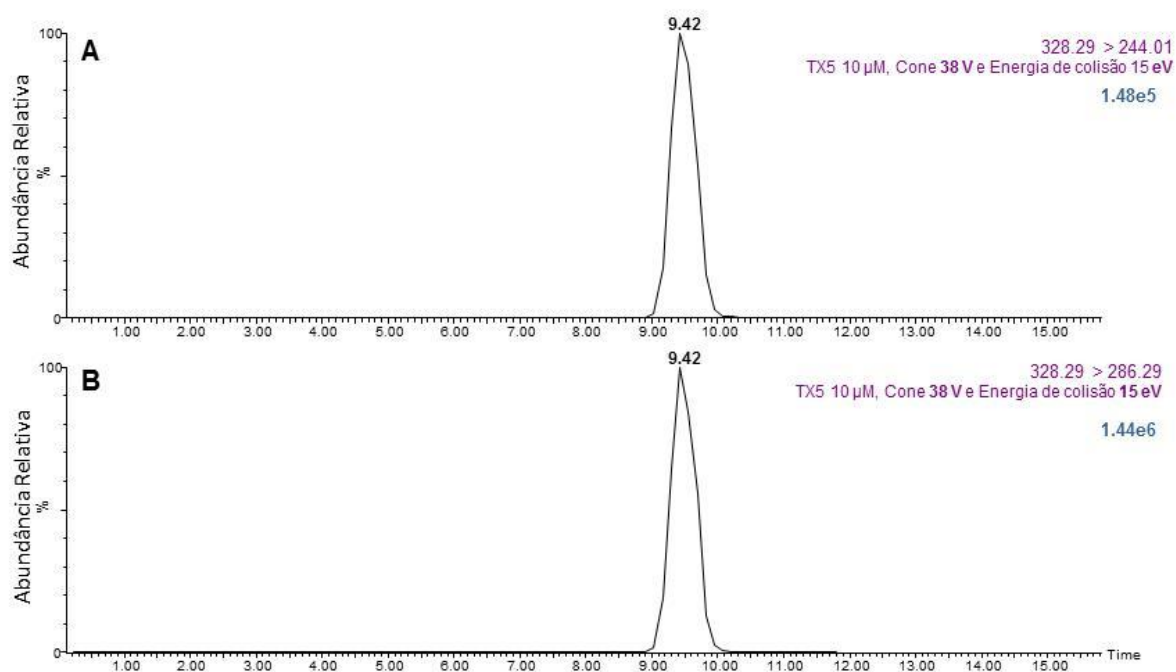


Figura 49 – Cromatograma obtido após injeção de TX5 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **38 V** e com uma energia de colisão **15 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,48e5). B- Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,44e6).

Pela análise das figura **43 a 49**, foi possível verificar que a energia de colisão que permite uma maior intensidade de sinal do ião 244 m/z é a EC de 30 eV (**figura 46**). Já para o fragmento 286 m/z a energia de colisão que permite uma maior intensidade de sinal analítico é a EC 20 eV (**figura 47**).

9.2.1.4 Otimização das condições de fragmentação e detecção da TX4 no sistema completo de LC-MS/MS

O processo anteriormente referido no que respeita à otimização da voltagem de cone e energia de colisão foi igualmente efetuado para a TX4. Para o efeito, fixou-se a energia de colisão definida previamente por infusão direta (27 eV) e determinou-se a voltagem de cone que permitia a obtenção de um sinal analítico com maior intensidade para cada um dos fragmentos maioritários da TX4 (244 e 286 m/z). Foram assim criadas múltiplas funções MRM em que se fez variar o valor de voltagem do cone em +2, -2, +5, -5, +10 e -10 V relativamente ao valor de 40V fixado anteriormente.

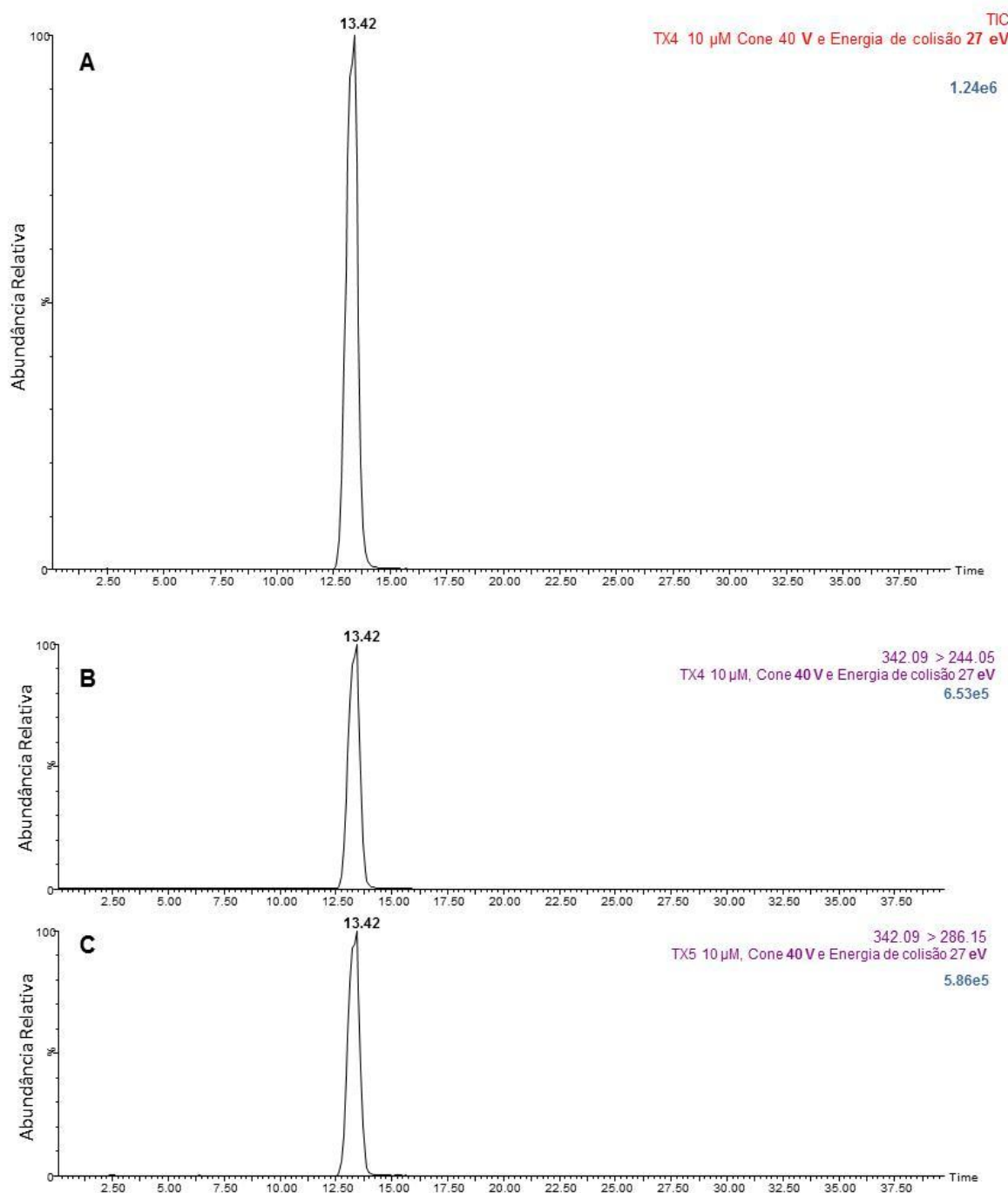


Figura 50 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **40 V** e com uma energia de colisão **27 eV**. A – Cromatograma obtido em modo TIC (sinal analítico corresponde à soma dos sinais detetados para os fragmentos 244 e 286 m/z da TX4. B – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 6,53e5). C- Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 5,86e5).

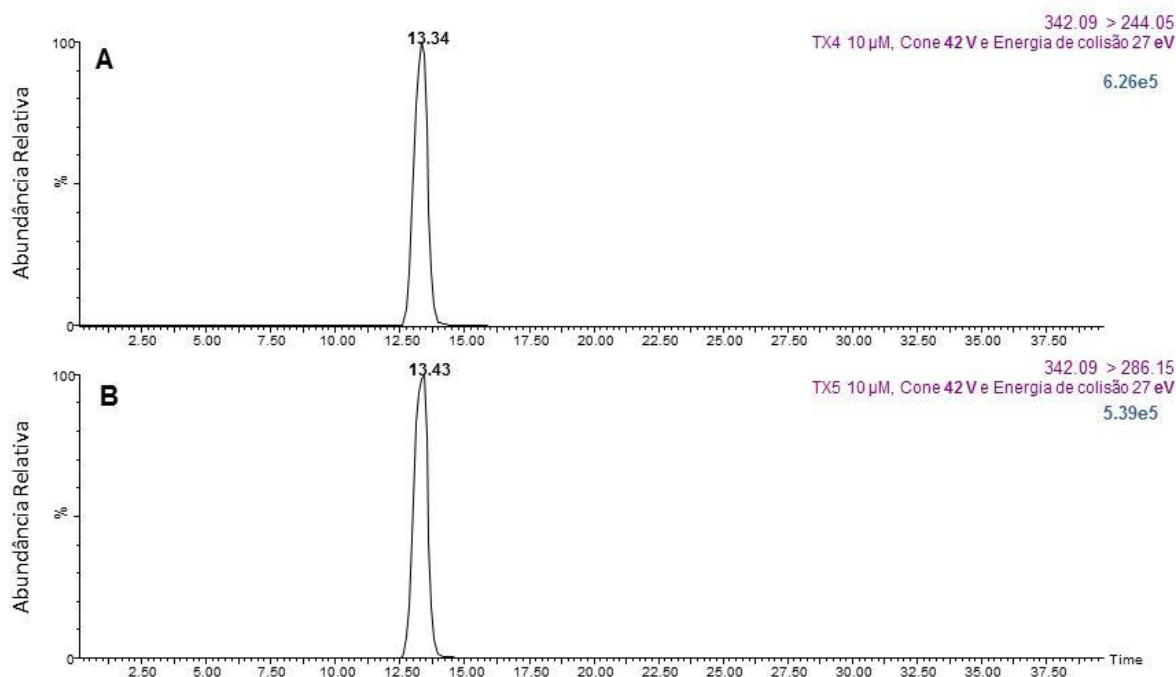


Figura 51 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **42 V** e com uma energia de colisão **27 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 6,26e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 5,39e5).

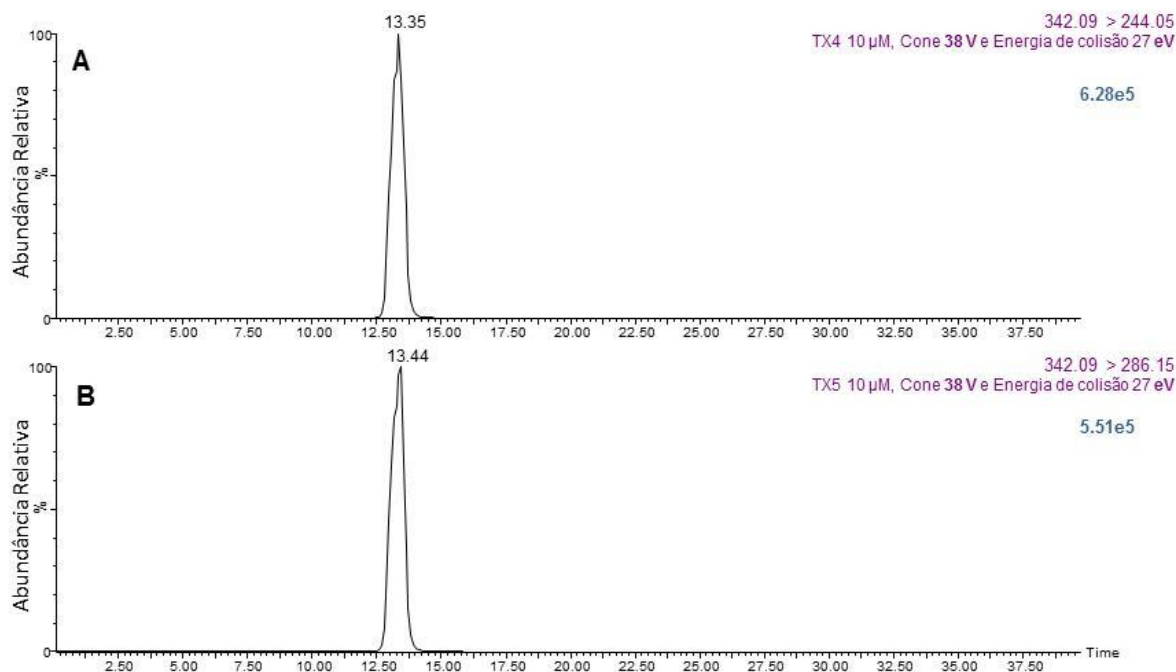


Figura 52 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **38 V** e com uma energia de colisão **27 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 6,28e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 5,51e5).

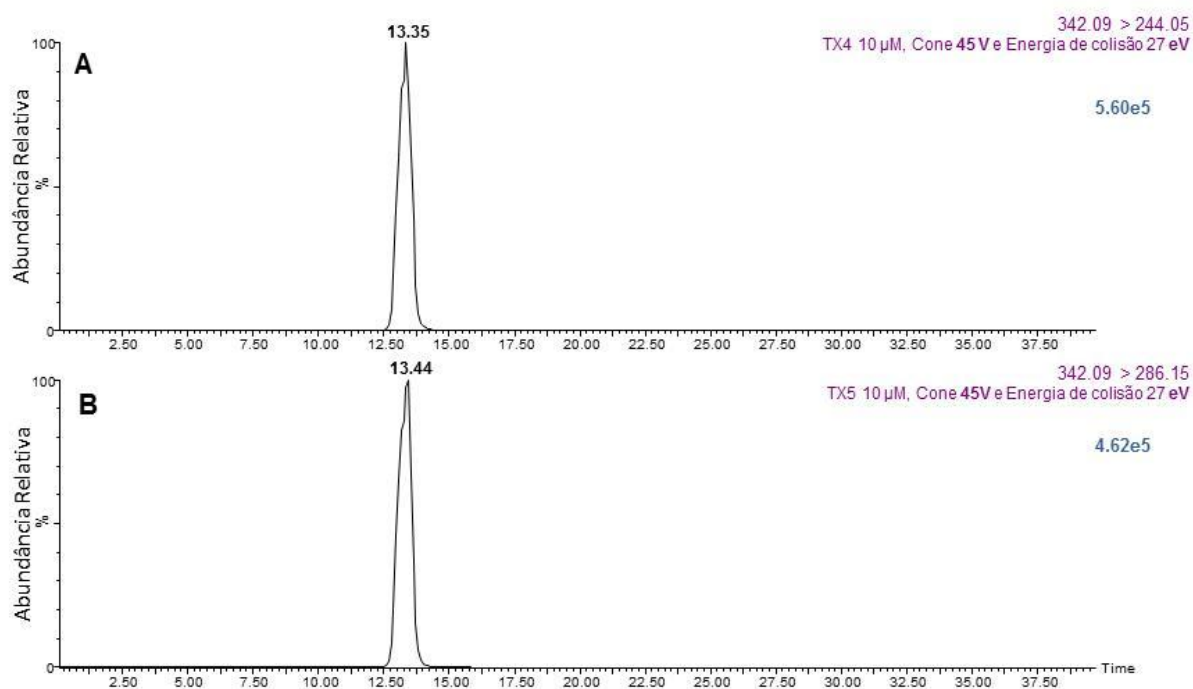


Figura 53 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **45 V** e com uma energia de colisão **27 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 5,60e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 4,62e5).

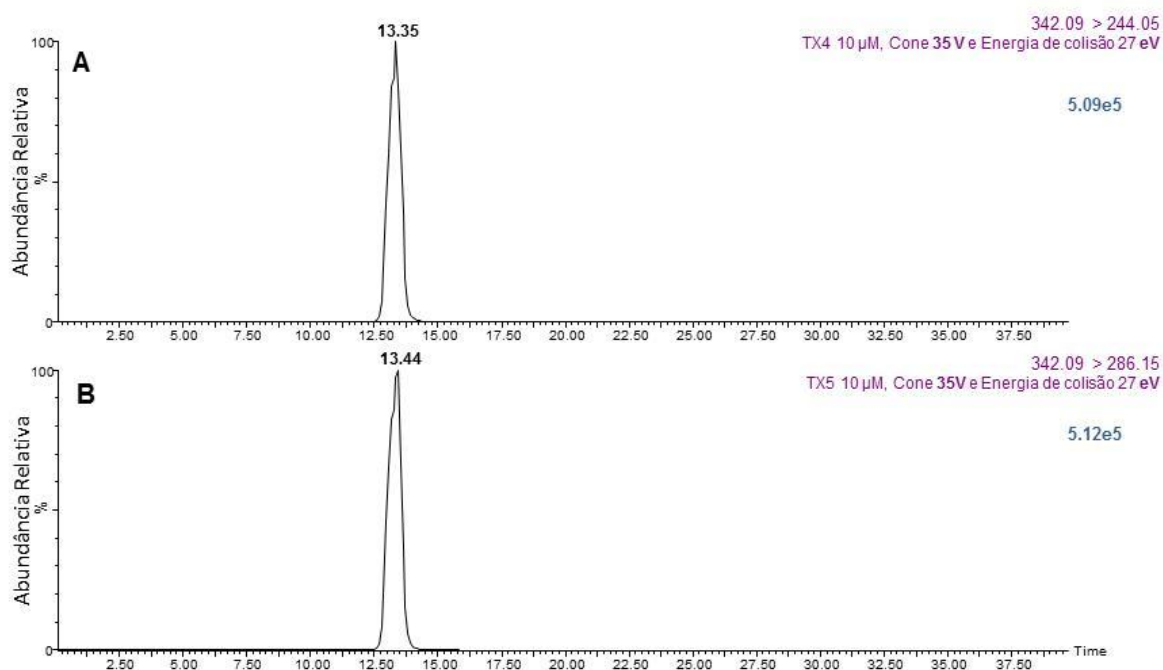


Figura 54 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **35 V** e com uma energia de colisão **27 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 5,09e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 5,12e5).

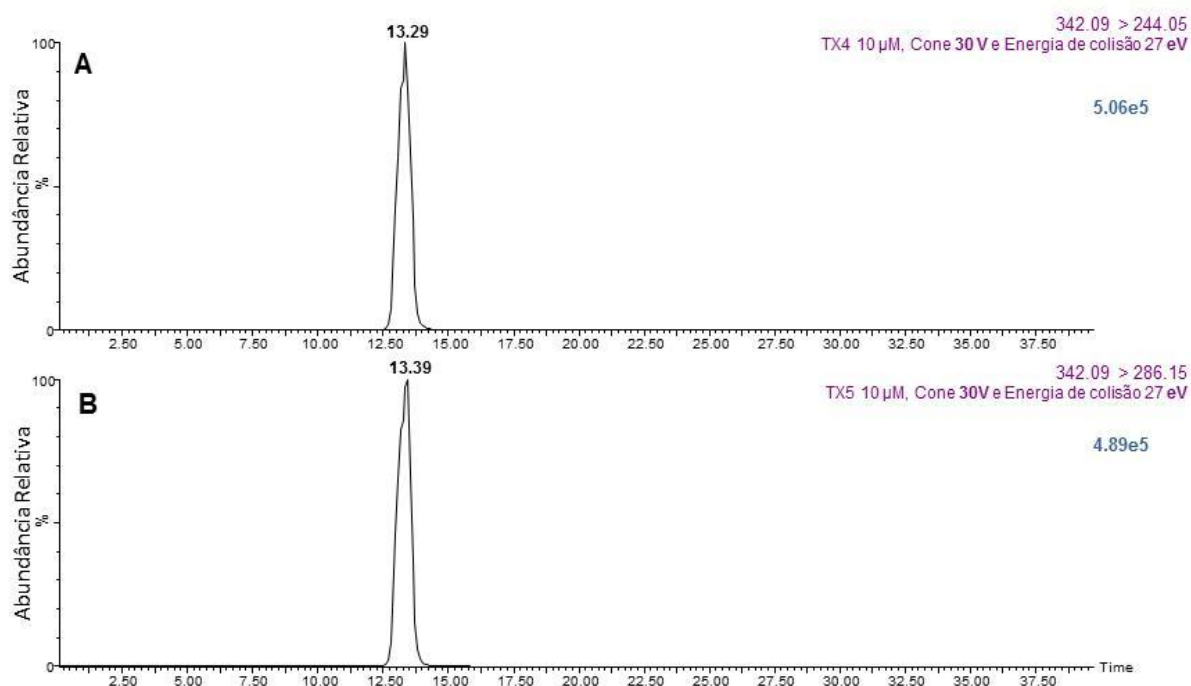


Figura 55 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **30 V** e com uma energia de colisão **27 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 5.06e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 4.89e5).

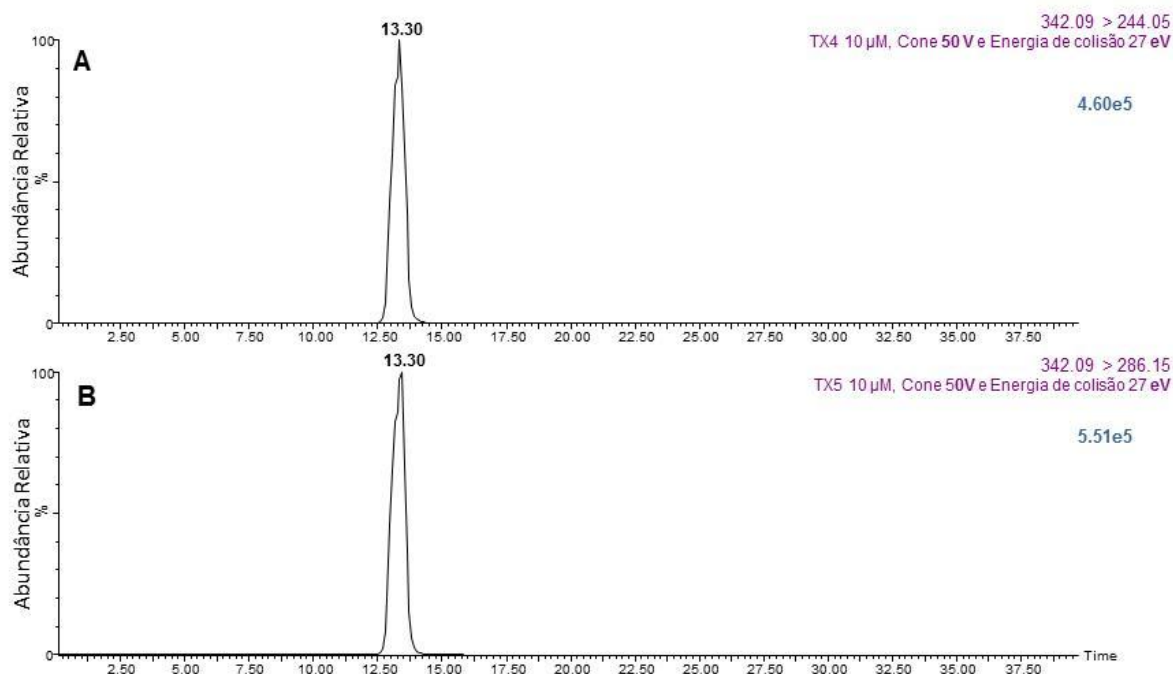


Figura 56 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **50 V** e com uma energia de colisão **27 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 4.60e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 5.51e5).

Pela análise dos cromatogramas anteriores foi possível verificar que os sinais analíticos de maior intensidade para os fragmentos 244 e 286 m/z da TX4 foram obtidos com uma voltagem de cone de 40 V (**figura 50**). Uma vez fixada a voltagem de cone procedeu-se à seleção da energia de colisão que permite a obtenção de um sinal analítico com maior intensidade para cada um dos referidos fragmentos. Assim, fez-se variar a energia de colisão previamente definida por infusão direta no espectrómetro de massas – 27 eV – em +2, -2, +5, -5, +10 e -10 eV, mantendo uma voltagem de cone de 40 V.

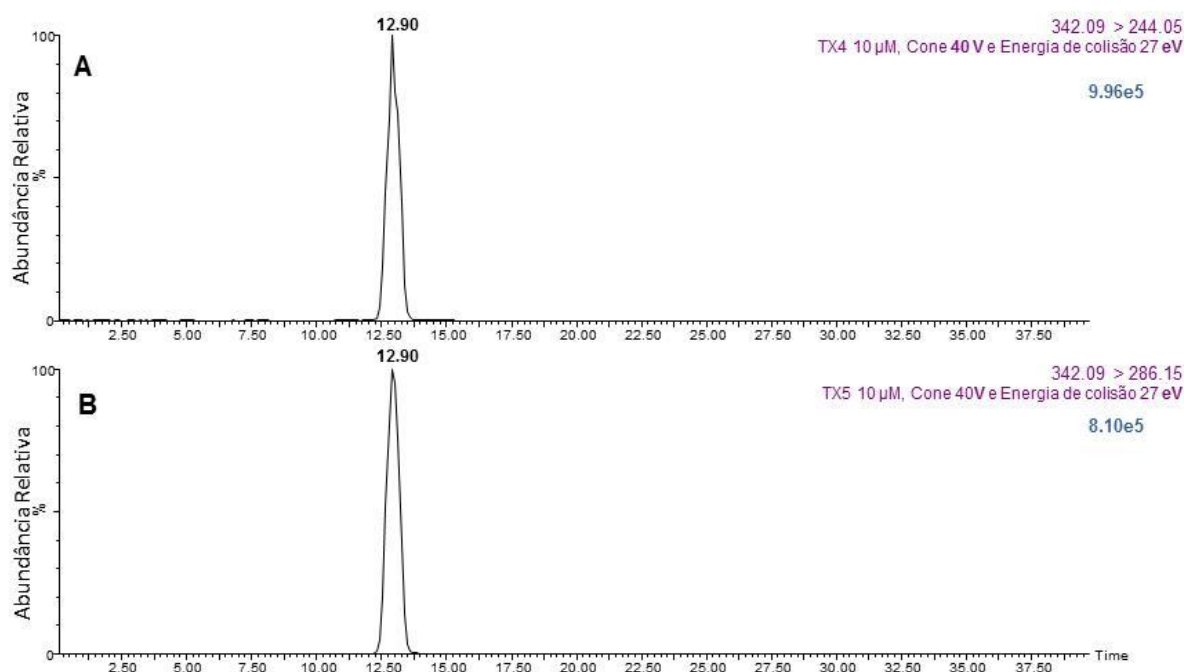


Figura 57 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A deteção foi efetuada com uma voltagem de cone de **40 V** e com uma energia de colisão **27 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 9,96e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 8,10e5).

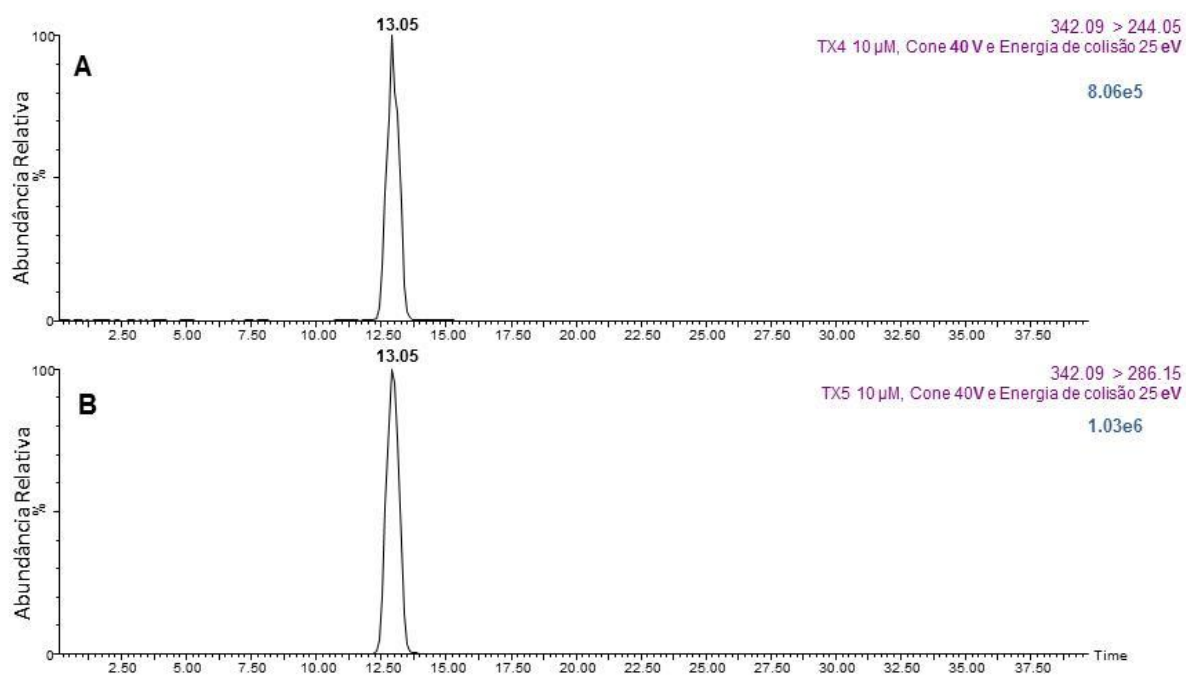


Figura 58 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **40 V** e com uma energia de colisão **25 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 8,06e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,03e6).

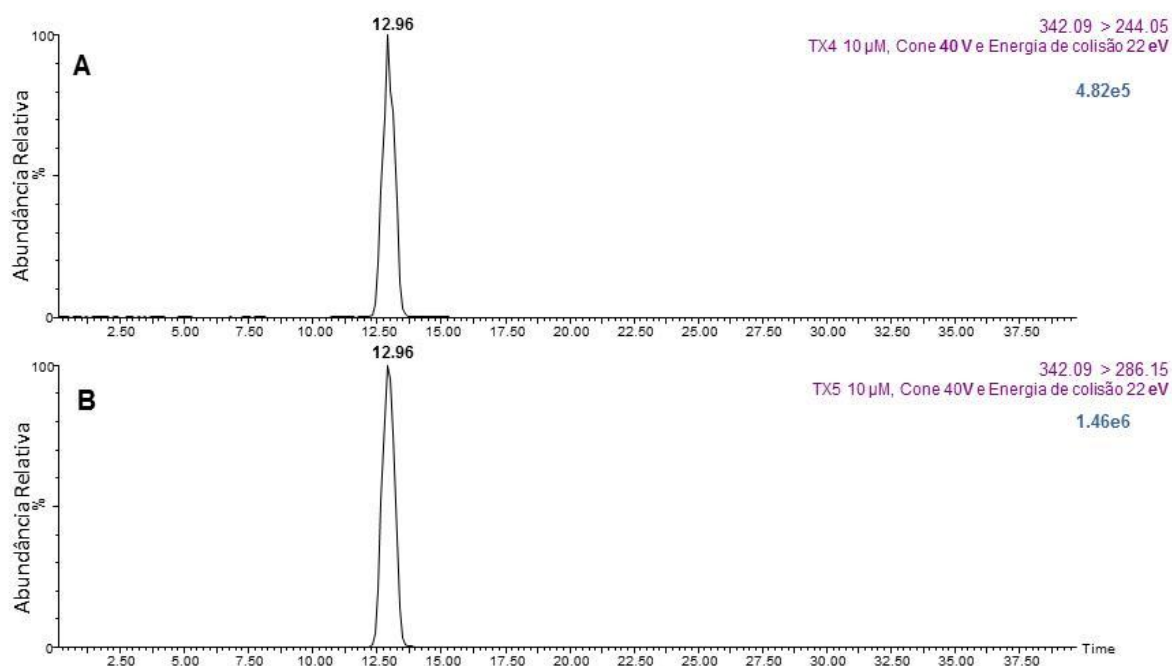


Figura 59 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **40 V** e com uma energia de colisão **22 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 4,82e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,46e6).

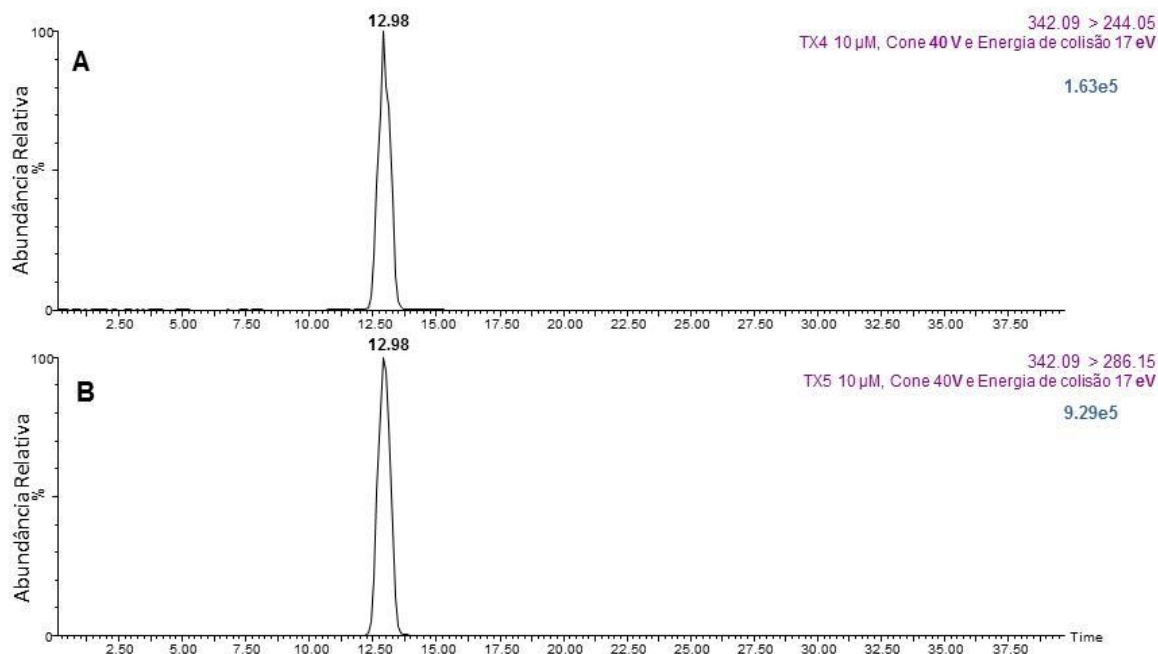


Figura 60 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **40 V** e com uma energia de colisão **17 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 1,63e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 9,29e5).

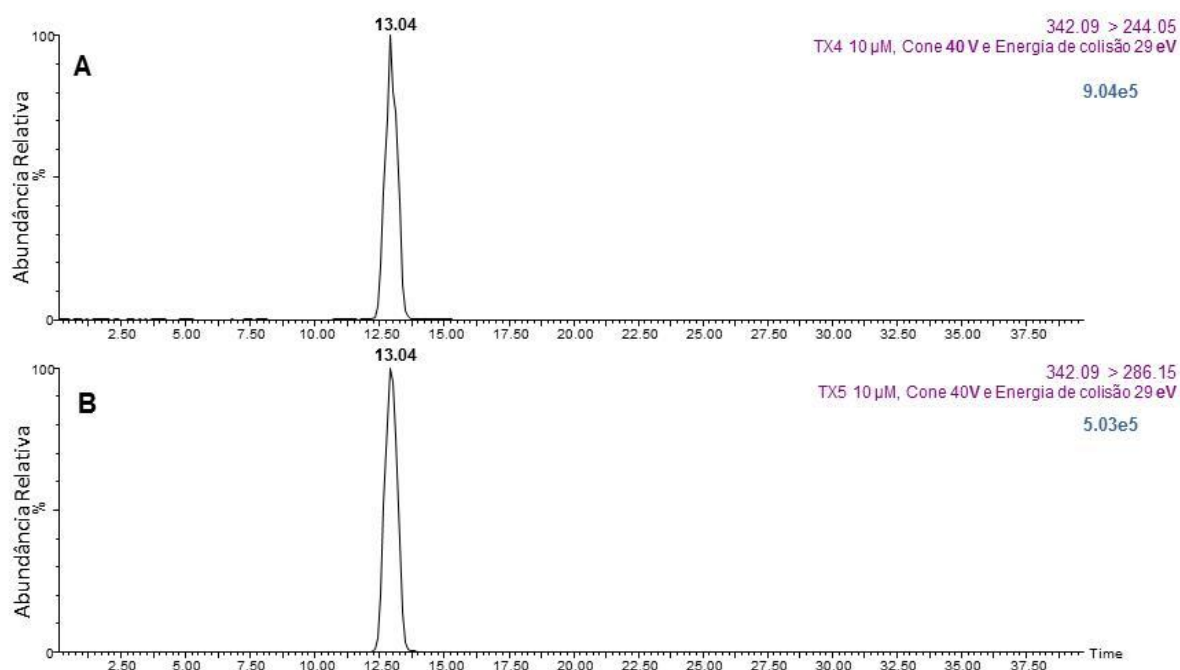


Figura 61 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **40 V** e com uma energia de colisão **29 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 9,04e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 5,03e5).

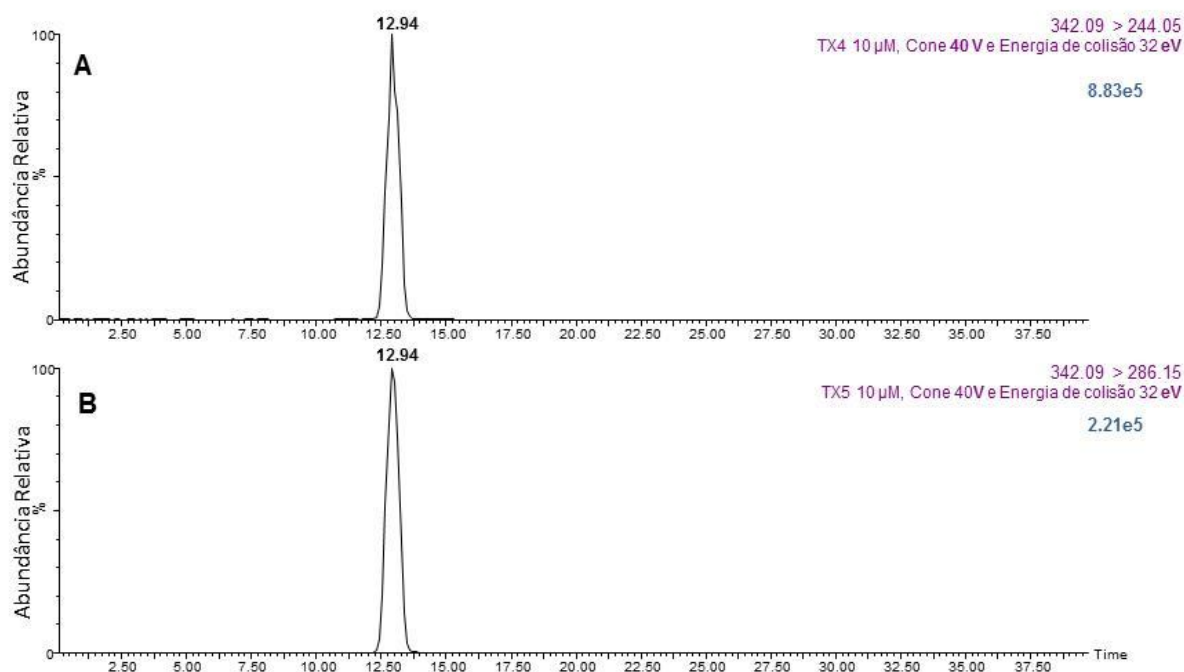


Figura 62 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **40 V** e com uma energia de colisão **32 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 8,83e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 2,21e5).

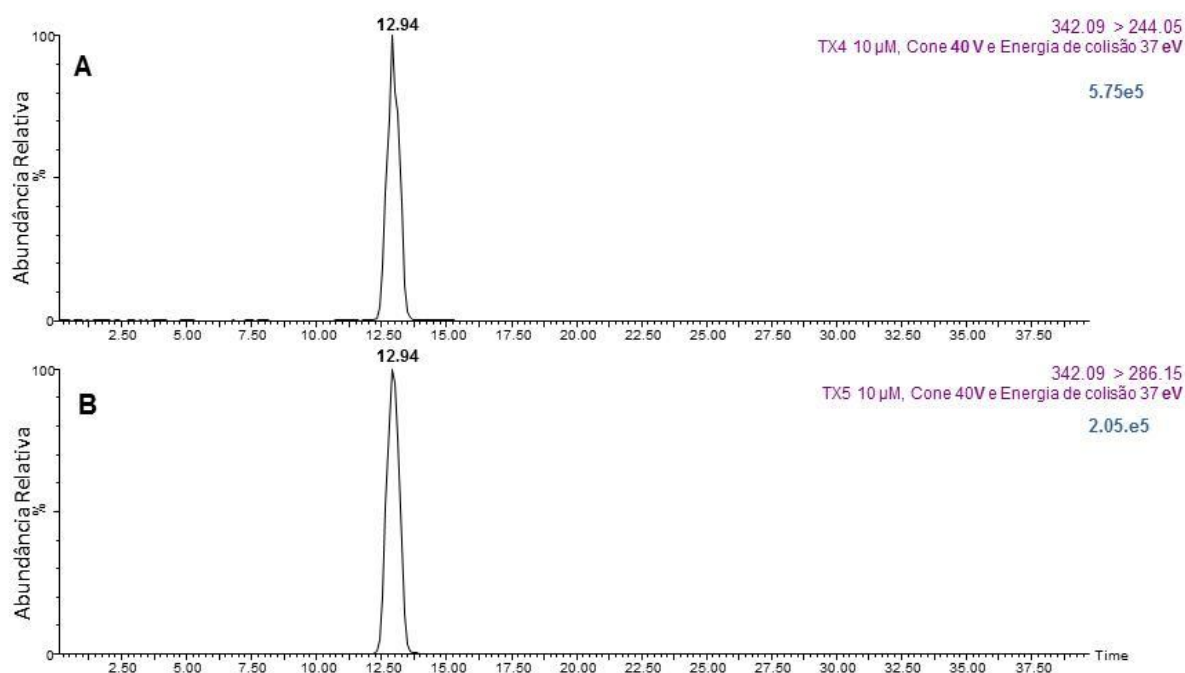


Figura 63 – Cromatograma obtido após injeção de TX4 10 µM no sistema de LC-MS/MS. A detecção foi efetuada com uma voltagem de cone de **40 V** e com uma energia de colisão **37 eV**. A – Cromatograma obtido para o fragmento 244 m/z (intensidade do sinal analítico: 5,75e5). B – Cromatograma obtido para o fragmento 286 m/z (intensidade do sinal analítico: 2,05e5).

Pela análise dos cromatogramas anteriores, foi possível verificar que a energia de colisão que permite uma maior intensidade de sinal do ião 244 m/z da TX4 é a EC de 27 eV (**figura 57**). Já para o fragmento 286 m/z a energia de colisão que permite uma maior intensidade de sinal analítico é a EC 22 eV (**figura 59**)

Em conclusão, os parâmetros definidos para analisar os compostos em estudo são apresentados na tabela x, no que respeita à voltagem do cone e à energia de colisão, relativamente a cada um dos dois iões produto detetados para cada derivado tioxantónico. De salientar que os cromatogramas acima ilustrados para o ajuste da voltagem de cone e da energia de colisão são representativos uma vez que cada ajuste foi efetuado mediante a realização de pelo menos 6 injeções de cada padrão de TX4 e TX5. Todas as injeções e análises posteriores efetuadas no seguimento deste trabalho foram sempre realizadas nas condições de deteção no espetrómetro de massas definidas na **tabela 9**.

Tabela 9 – Voltagem de cone e energia de colisão otimizadas para a deteção dos iões produtos maioritários (244 e 286 m/z) da TX5 e TX4.

Composto	Ião Molecular (m/z)	Iões produto (m/z)	Voltagem de Cone (V)	Energia de Colisão (eV)
TX5	328	244	38	30
		286	38	20
TX4	342	244	40	27
		286	40	22

9.2.2 Desenvolvimento de uma metodologia para extração da TX5 das amostras de HBSS recolhidas nos estudos de permeabilidade

No âmbito do presente trabalho foi necessário desenvolver uma metodologia para extração da TX5 das amostras recolhidas nos estudos de permeabilidade, dada a impossibilidade de injeção direta dessas amostras no sistema de LC-MS/MS. O objetivo do desenvolvimento dessa metodologia era, assim, extrair a maior quantidade possível do analito em estudo, permitindo assim a sua posterior injeção e análise no sistema cromatográfico. Deste modo, vários parâmetros foram otimizados com o objetivo de maximizar a recuperação do analito da amostra, nomeadamente:

- Solvente orgânico a utilizar;
- pH;
- Efeito do aquecimento das amostras;
- Número de extracções sequenciais.

Após comparação do sinal analítico (área do pico) obtido com padrões de TX5 e TX4 submetidos ao processo extrativo com o sinal analítico obtido para os padrões dos derivados tioxantónicos não submetido ao referido processo, foi possível calcular a percentagem de analito extraído, ou seja, o rendimento extrativo da metodologia desenvolvida. Esta análise foi efetuada para cada um dos iões produto da TX5 e da TX4, após a injeção no sistema de LC-MS/MS, nas condições cromatográficas e de deteção previamente definidas.

9.2.2.1 Seleção do Solvente Orgânico e avaliação do efeito do pH no rendimento extrativo

A otimização inicial do processo extrativo com a seleção do solvente extrator e a avaliação o efeito do pH e da temperatura no respetivo rendimento foi apenas efetuada para a TX5. No que respeita ao solvente orgânico extrator foram inicialmente testados dois solventes diferentes: o Acetato de Etilo (AE) e o Éter Etílico (EE) e, após extração de um padrão de TX5 de concentração conhecida (0,5 μM), o sinal analítico obtido (área do pico) para cada um dos iões produto da TX5 (iões 244 e 286 m/z) foi comparado com a área do pico dos mesmos fragmentos (iões 244 e 286 m/z) obtidas após a injeção de 10 μL de padrão de TX5 0.5 μM preparado diretamente em metanol. Mediante a análise das áreas dos picos dos dois fragmentos maioritários da TX5 foi possível verificar a ausência de diferenças entre os dois solventes extratores no que respeita à percentagem de TX5 extraída, com um rendimento extrativo de sensivelmente 20% (**figura 64 e tabela 10**).

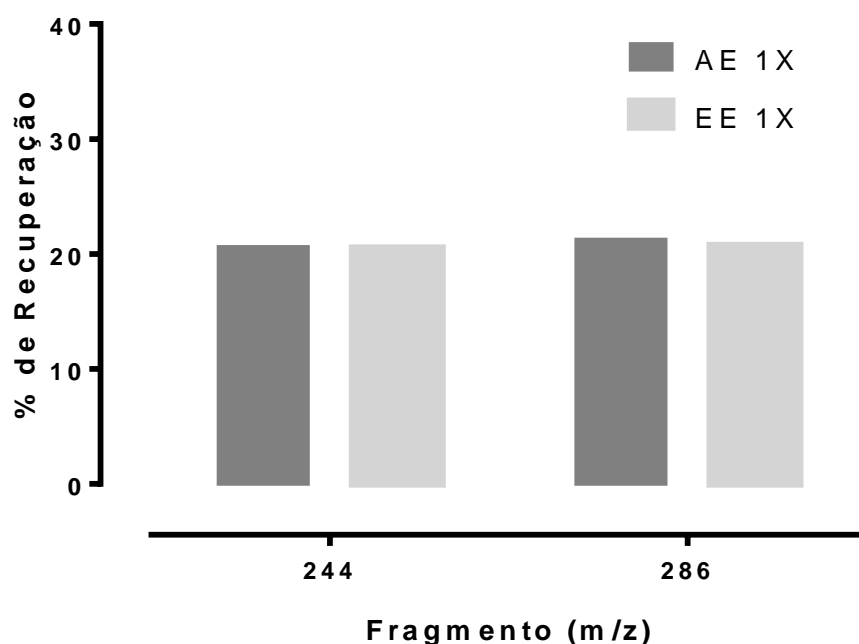


Figura 64 – Percentagem de recuperação da TX5 (0,5 µM) após extração com AE ou EE. Resultados obtidos após injeção no sistema de LC-MS/MS (10 µL, em duplicado) e análise da área dos picos dos dois fragmentos maioritários (iões 244 e 286 m/z) detetados nos padrões de TX5 extraídos, comparativamente com os padrões de TX5 não extraídos.

Tabela 10 – Percentagem de recuperação da TX5 (0,5 µM) após extração com AE ou EE.

Fragmento (m/z)	% Recuperação	
	AE 1X	EE 1X
244	20,60	20,50
286	21,26	20,72

Dado o reduzido rendimento extrativo alcançado nos estudos anteriores, foi posteriormente avaliada a percentagem de recuperação da TX5 após a alteração do valor de pH da extração mediante a adição de HBSS com um valor de pH de 12,5 (pH final da amostra = 12,1). Foi igualmente avaliado o efeito de uma segunda extração sequencial do padrão de TX5 0,5 µM no potencial aumento do rendimento extrativo deste derivado tioxantónico. Esta análise foi novamente efetuada para ambos os fragmentos maioritários da TX5 mediante a análise da área do pico cromatográfico obtida e a correspondente comparação com as áreas obtidas com a injeção de um padrão de TX5 0,5 µM preparado diretamente em metanol e, por isso, não submetido ao processo extrativo. Foi novamente possível verificar a ausência de diferenças significativas no rendimento extrativo obtido com os dois solventes utilizados (**figura 65 e tabela 11**). Contudo, a adição de HBSS pH 12,5 à amostra antes da adição do solvente extrator permitiu aumentar para

sensivelmente o dobro o rendimento extrativo ($\pm 50\%$). O maior rendimento extrativo obtido com a alteração do valor de pH justifica-se pelo facto de que, com o aumento do pH, foi possível aumentar a fração de TX5 na forma não ionizada, ou seja, aumentar a fração de TX5 não hidrossolúvel e, por isso, mais facilmente extraída com solventes orgânicos. Pelo contrário, a diminuição do valor de pH não foi testada no âmbito do presente trabalho uma vez que aumentaria a fração de TX5 na sua forma ionizada, ou seja, na sua forma hidrossolúvel, diminuindo o rendimento extrativo com o solvente orgânico. No entanto, a realização de uma extração adicional (AE 2X e EE 2X) não permitiu aumentar a percentagem de recuperação relativamente à obtida com a utilização de apenas 1 mL de solvente extrator (**figura 65 e tabela 11**).

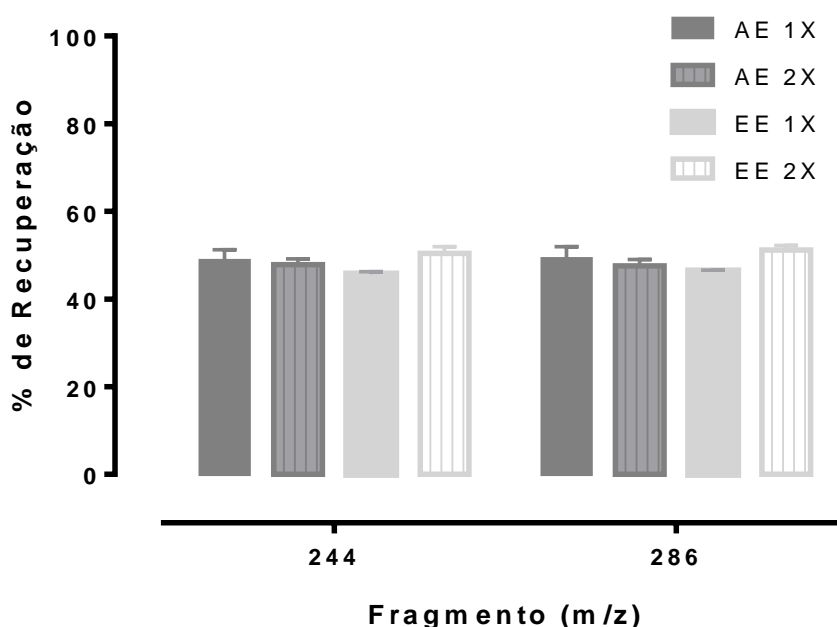


Figura 65 – Percentagem de recuperação da TX5 (0,5 μM) obtida com a extração do analito com AE ou EE após adição de 200 μL de HBSS pH 12,5. Resultados obtidos após injeção no sistema de LC-MS/MS (10 μL , em duplicado) e análise da área dos picos dos dois fragmentos maioritários (íões 244 e 286 m/z) detetados nos padrões de TX5 extraídos, comparativamente com os padrões de TX5 não extraídos. Os resultados estão expressos como média \pm SD (em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de Two-way ANOVA, seguido pelo *Sidak's multiple comparisons test*. SD – Desvio padrão.

Tabela 11 - Percentagem de recuperação da TX5 (0,5 µM) obtida com a extração do analito com AE ou EE após adição de 200 µL de HBSS pH 12,5.

Fragmento (m/z)	% Recuperação							
	AE 1X		AE 2X		EE 1X		EE 2X	
	Média ± SD	CV (%)	Média ± SD	CV (%)	Média ± SD	CV (%)	Média ± SD	CV (%)
244	48,73 ± 2,51	5,16	47,86 ± 1,30	2,71	45,70 ± 0,53	1,15	50,40 ± 1,52	3,01
286	49,17 ± 2,81	5,72	47,76 ± 1,49	3,14	46,39 ± 0,19	0,41	51,21 ± 1,00	1,96

Dada a ausência de diferenças significativas no rendimento extrativo obtido com os dois solventes orgânicos, e dada a maior facilidade de manuseamento do acetato de etilo, foi este o solvente selecionado para prosseguir com a otimização das condições de extração da TX5.

9.2.2.2 Avaliação do efeito da Temperatura no rendimento extrativo

Para estudo do efeito da temperatura no rendimento extrativo, após a adição do solvente extrator procedeu-se ao aquecimento das amostras a 40°C durante 10 minutos.

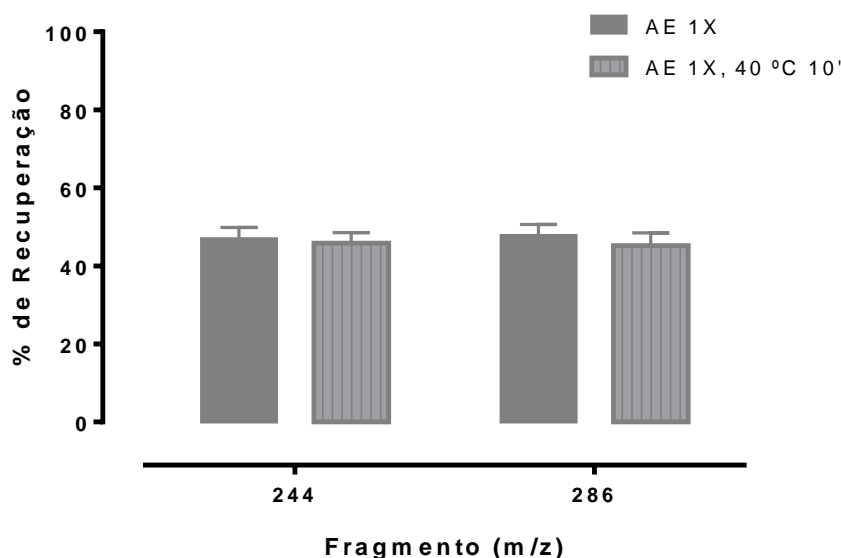


Figura 66 – Percentagem de recuperação da TX5 (0,5 µM) obtida após a extração com AE e aquecimento da amostra a 40°C durante 10 minutos. Resultados obtidos após injeção no sistema de LC-MS/MS (10 µL, em duplicado) e análise da área dos picos dos dois fragmentos maioritários (íões 244 e 286 m/z) detetados nos padrões de TX5 extraídos, comparativamente com os padrões de TX5 não extraídos. Os resultados estão expressos como média ± SD (em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de Two-way ANOVA, seguido pelo *Sidak's multiple comparisons test*. SD – Desvio padrão.

Tabela 12 - Percentagem de recuperação da TX5 (0,5 µM) obtida após a extração com AE e aquecimento da amostra a 40°C durante 10 minutos.

Fragmento	% Recuperação			
	AE 1X		AE 1X, 40 °C 10'	
	Média ± SD	CV (%)	Média ± SD	CV (%)
244	46,94 ± 2,92	2,92	45,85 ± 2,69	2,69
286	47,75 ± 2,85	2,85	45,19 ± 3,27	3,28

Pela análise da **figura 66** e da **tabela 12**, é possível verificar a ausência de diferenças significativas na percentagem de recuperação da TX5 entre os padrões extraídos com processo de aquecimento e os padrões extraídos com AE à temperatura ambiente.

9.2.2.3 Avaliação do rendimento extrativo do Padrão Interno

O Padrão Interno é uma substância ausente na amostra e padrões, adicionada em quantidade constante a todas as amostras, brancos e padrões. Tem como a finalidade a compensação de potenciais erros aleatórios e sistemáticos que podem surgir na preparação, extração e injeção das amostras, assim como eventuais efeitos de matriz. Assim, na metodologia desenvolvida no presente trabalho laboratorial, utilizou-se como PI a TX4, uma tioxantona estruturalmente semelhante à TX5, com o objetivo de corrigir eventuais perdas de analito no processo extrativo, assim como eventuais erros na injeção no sistema de LC-MS/MS. Deste modo, para a TX4 poder ser utilizada com confiança no presente trabalho deve, além de apresentar um comportamento cromatográfico idêntico à TX5 com eficiente resolução e separação dos picos cromatográficos, apresentar um rendimento extrativo idêntico ao da TX5.

Deste modo, procedeu-se à comparação do rendimento extrativo da TX5 e da TX4 quando presentes, simultaneamente, em concentrações equimolares – 1 µM (20 µL TX5/TX4 20 µM + 190 µL HBSS). Foi igualmente avaliado o efeito de um novo aumento do pH no rendimento extrativo de ambos os derivados tioxantônicos (a adição de HBSS pH 13,5 antes da adição do solvente extrator levou a um aumento do valor de pH do padrão de TX5 + TX4 para 13,2). Após injeção de padrões sujeitos ao processo extrativo (10 µL) foi determinada a área dos picos dos dois fragmentos maioritários de ambos os compostos (244 e 286 m/z), e comparada com a área obtida para os mesmos fragmentos nos padrões não sujeitos ao processo extrativo.

Pela análise da figura 4 e da tabela 4 é possível verificar a ausência de diferenças significativas entre o rendimento extrativo calculado para cada fragmento de cada composto. A ausência de diferenças significativas demonstra que ambos os compostos apresentam um rendimento extrativo idênticos e que, por isso, a utilização de TX4 como padrão interno adequado

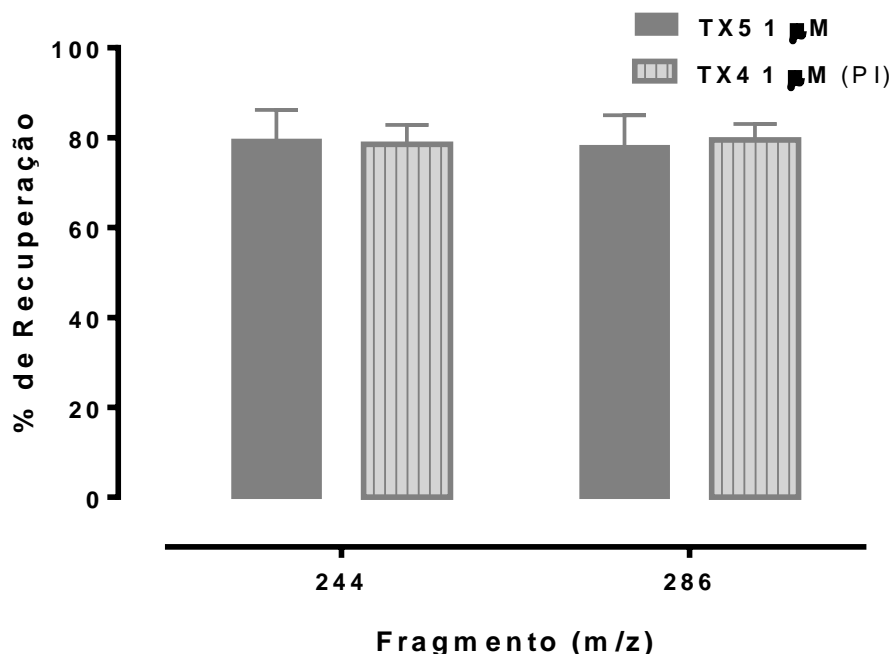


Figura 67 – Percentagem de recuperação da TX5 (1μM) e da TX4 (1μM) obtida com a extração com AE após a adição de HBSS pH 13,5. Resultados obtidos após injeção no sistema de LC-MS/MS (10 μL, em duplicado) e análise da área dos picos dos dois fragmentos maioritários (iões 244 e 286 m/z) de cada derivado tioxantônico presentes nos padrões de TX5 + TX4 extraídos, comparativamente com os padrões de TX5 + TX4 não extraídos. Os resultados estão expressos como média ± SD (em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de Two-way ANOVA, seguido pelo *Sidak's multiple comparisons test*. SD – Desvio padrão.

Tabela 13 - Percentagem de recuperação da TX5 (1μM) e da TX4 (1μM) obtida com a extração com AE após a adição de HBSS pH 13,5.

Fragmento (m/z)	% Recuperação			
	TX5 1μM		TX4 1 μM (PI)	
	Média ± SD	CV (%)	Média ± SD	CV (%)
244	79,35 ± 8,87	6,87	78,56 ± 4,31	4,31
286	78,00 ± 7,03	7,03	79,52 ± 3,50	3,50

A comparação dos resultados obtidos com a adição de HBSS pH 13,5 (**figura 67**) com os resultados obtidos mediante a adição de HBSS pH 12,5 (**figura 65**), embora efetuados com diferentes concentrações de TX5 (1 μM no primeiro caso e 0.5 μM no segundo), permitiu verificar que o aumento do valor de pH da amostra se traduziu num aumento significativo da percentagem de recuperação do derivado tioxantónico (**figura 68**).

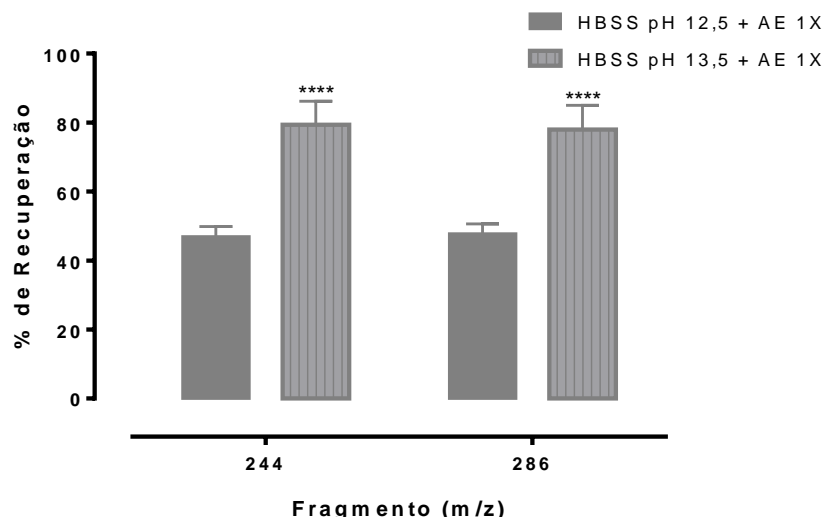


Figura 68 - Percentagem de recuperação da TX5 obtida com a extração com AE após a adição de HBSS pH 13,5 ou pH 12,5. Resultados obtidos após injeção no sistema de LC-MS/MS (10 μL , em duplicado) e análise da área dos picos dos dois fragmentos maioritários (íões 244 e 286 m/z) detetados nos padrões de TX5 extraídos, comparativamente com os padrões de TX5 não extraídos. Os resultados estão expressos como média \pm SD (em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de Two-way ANOVA, seguido pelo *Sidak's multiple comparisons test* (****p < 0,0001 vs. Adição de HBSS pH 12,5).. SD – Desvio padrão.

Em conclusão, com estes estudos foi possível verificar que a TX4 tem um rendimento extrativo semelhante ao da TX5, e que o aumento do pH do HBSS provoca também um aumento significativo da percentagem de recuperação da TX5.

9.2.2.4 Validação do método extrativo

Após a otimização dos diferentes parâmetros envolvidos no processo extrativo procedeu-se à validação do método extrativo. Para o efeito, foi avaliado o rendimento da extração de diferentes concentrações de TX5 e TX4. O estudo foi efetuado em triplicado e com a extração simultânea de TX5 e TX4 em concentrações equimolares: 0,01, 0,1, 1 e 10 μM .

O objetivo foi verificar se a concentração do analito afecta o rendimento extrativo e, mais uma vez, se o analito e o padrão interno têm comportamentos idênticos durante o processo de extração. Após a extração de padrões contendo TX4 e TX5 em concentrações equimolares (em triplicado) procedeu-se à sua injeção (10 μ L, em duplicado) no sistema de LC-MS/MS e à comparação das áreas dos picos dos fragmentos 244 e 286 m/z de cada derivado tioxantónico com as áreas obtidas após injeção de padrões não sujeitos ao processo extrativo.

Tabela 14 - Concentração de padrões de TX4 e TX5 testados na validação do processo extrativo. Para cada concentração de padrão de TX4 + TX5 foram efetuadas 3 extrações independentes.

Padrões	TX4	TX5
Concentração	0,01 μ M	0,01 μ M
	0,1 μ M	0,1 μ M
	1 μ M	1 μ M
	10 μ M	10 μ M

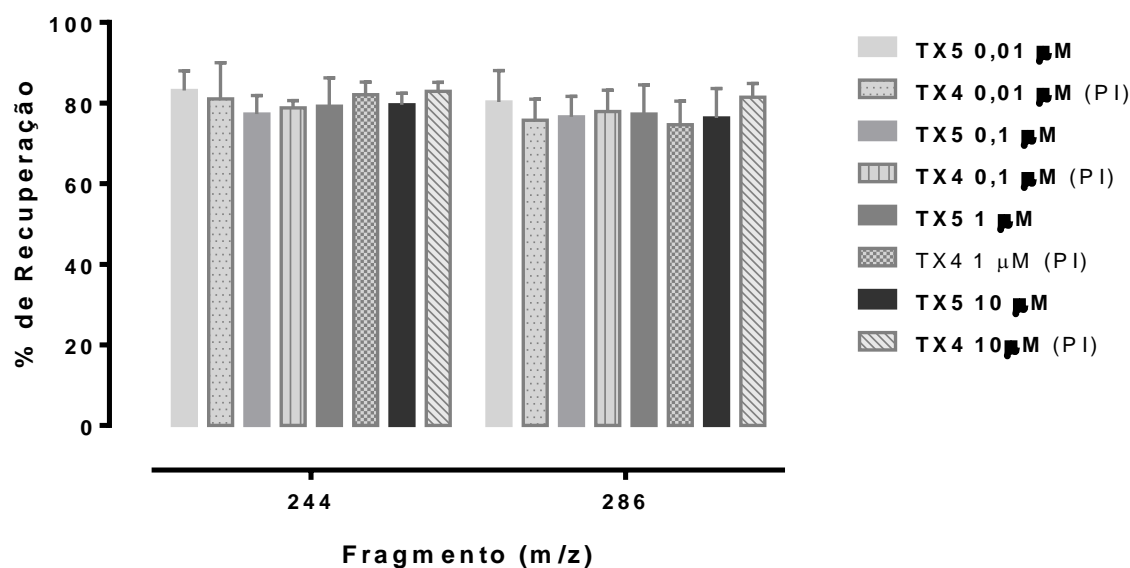


Figura 69 - Percentagem de recuperação da TX5 e TX4 em diferentes concentrações, obtida com a extração com AE após a adição de HBSS pH 13,5. Resultados obtidos após injeção no sistema de LC-MS/MS (10 μ L, em duplicado) e análise da área dos picos dos dois fragmentos maioritários (iões 244 e 286 m/z) de cada derivado tioxantónico presentes nos padrões de TX5 + TX4 extraídos, comparativamente com os padrões de TX5 + TX4 não extraídos. Os resultados estão expressos como média \pm SD (em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de Two-way ANOVA, seguido pelo *Sidak's multiple comparisons test*. SD – Desvio padrão.

Tabela 15 - Percentagem de recuperação da TX5 e TX4 em diferentes concentrações, obtida com a extração com AE após a adição de HBSS pH 13,5.

Fragmento (m/z)	% Recuperação			
	244		286	
	Média ± SD	CV (%)	Média ± SD	CV (%)
TX5 0,01 µM	83,15 ± 4,88	4,88	80,25 ± 7,80	7,81
TX4 0,01 µM (PI)	81,07 ± 8,97	8,97	75,74 ± 5,24	5,24
TX5 0,1 µM	77,30 ± 4,59	4,59	76,58 ± 5,06	5,06
TX4 0,1 µM (PI)	78,84 ± 1,78	1,78	77,87 ± 5,32	5,32
TX5 1 µM	79,23 ± 7,05	7,05	77,25 ± 7,28	7,28
TX4 1 µM (PI)	82,10 ± 3,08	3,08	74,66 ± 5,80	5,80
TX5 10 µM	79,60 ± 2,81	2,81	76,31 ± 7,30	7,30
TX4 10 µM (PI)	82,93 ± 2,17	2,17	81,48 ± 3,38	3,38

Tal como é possível observar pela análise da **figura 69** e **tabela 15**, não existem diferenças significativas no rendimento extrativo obtido após extração de padrões com diferentes concentrações TX5 e TX4. Além da ausência de um efeito significativo da concentração na percentagem de recuperação de ambos os derivados tioxantónicos, não se verificaram igualmente diferenças significativas no que respeita ao rendimento extrativo de cada composto. Ou seja, o rendimento extrativo da TX5 e da TX4 são muito semelhantes, demonstrando novamente a adequabilidade da utilização da TX4 como padrão interno.

9.2.3 Ensaios de Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma determinada gama de concentração. Em termos gráficos a linearidade define-se pelo declive da reta formada pelo sinal analítico (área do pico) em relação à concentração de analito na amostra.

Inicialmente, com base nos resultados obtidos no estudo anterior em que se procedeu à extração de padrões de TX5 + TX4, foram determinadas as áreas dos picos de cada um dos dois fragmentos maioritários da TX5 e TX4 (244 e 286 m/z) e efetuada a sua correlação com a concentração de analito na amostra. Neste estudo preliminar foram utilizados apenas cinco pontos da curva de calibração (0; 0,01; 0,1; 1 e 10 µM) de modo a verificar a linearidade de resposta do detetor em função da concentração de analito e, ao mesmo tempo, a manutenção da linearidade da resposta do detetor após o processo de

extração. Tal como se pode verificar pela análise da **figura 70 e 71**, foi possível observar a existência de linearidade de resposta do detetor de massas para os dois iões maioritários de ambos os derivados tioxantónicos, na gama de concentrações testada.

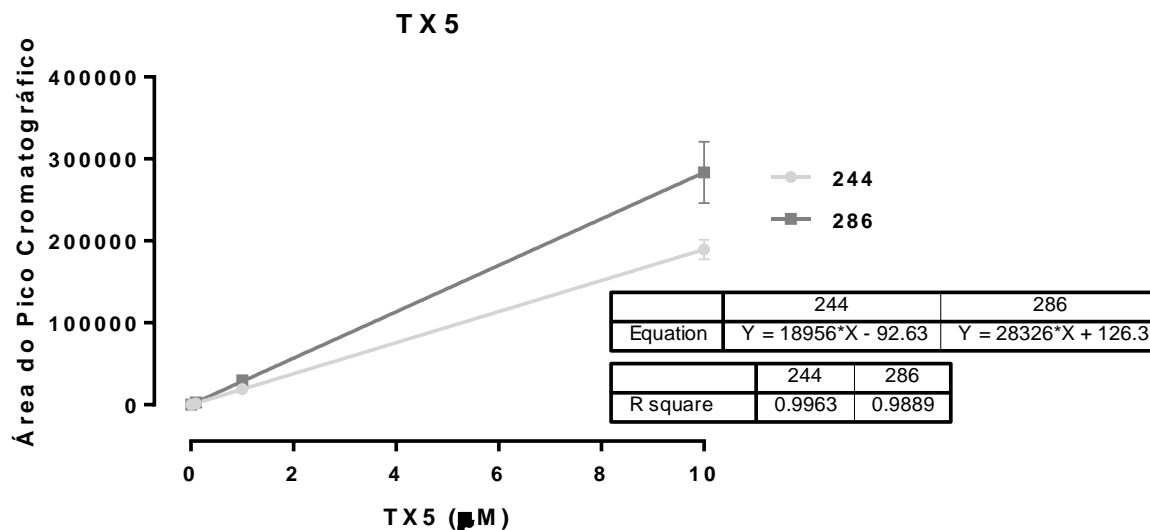


Figura 70 – Representação gráfica da reta de calibração que relaciona a área do pico de cada fragmento maioritário da TX5 (244 e 286 m/z) com a concentração de TX5 (µM). Os resultados estão expressos como media ± SD (em triplicado).

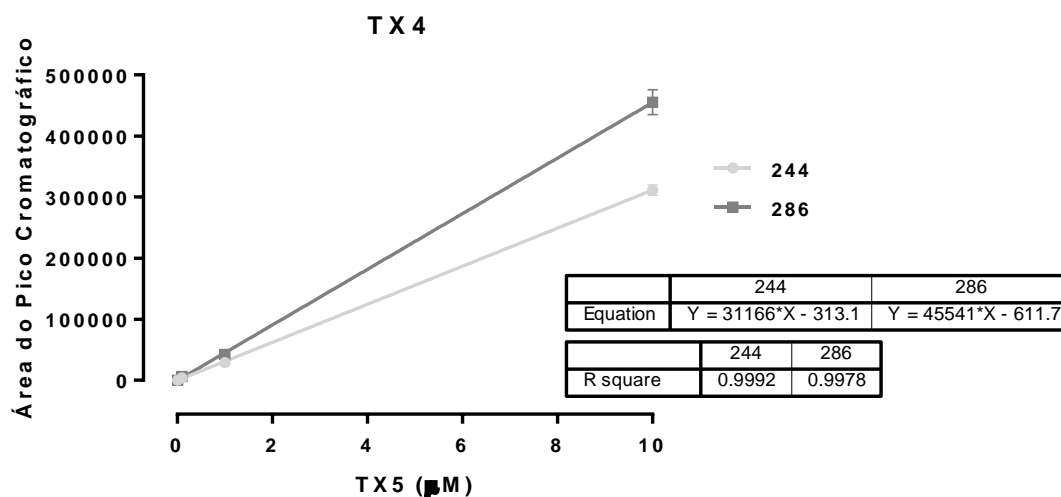


Figura 71 - Representação gráfica da reta de calibração que relaciona a área do pico de cada fragmento maioritário da TX4 (244 e 286 m/z) com a concentração de TX4 (µM). Os resultados estão expressos como media ± SD (em triplicado).

Tendo por base os resultados acima referidos, procedeu-se à avaliação da linearidade de resposta do detetor de massas em função da concentração de TX5, testando uma gama de concentrações de TX5 mais alargada (0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5, 1, 5, 10 e 20 μM), e fixando a concentração de PI. Foram testadas duas concentrações diferentes de PI - 1 μM (curva 1) e 0,1 μM (curva 2) - e cada padrão de TX5 com uma determinada concentração de PI foi preparado em duplicado, sujeito ao processo extrativo e injectado (10 μL), em duplicado, no sistema de LC-MS/MS.

No presente estudo, dada a utilização de PI a correlação foi efetuada entre a concentração de analito (TX5) e a razão entre o sinal analítico do analito (TX5) e o sinal analítico do PI (TX4). Para o efeito, foram determinadas as áreas dos picos dos iões 244 e 286 (m/z) de cada derivado tioxantónico presente em cada padrão de calibração e calculadas as seguintes razões de áreas de picos:

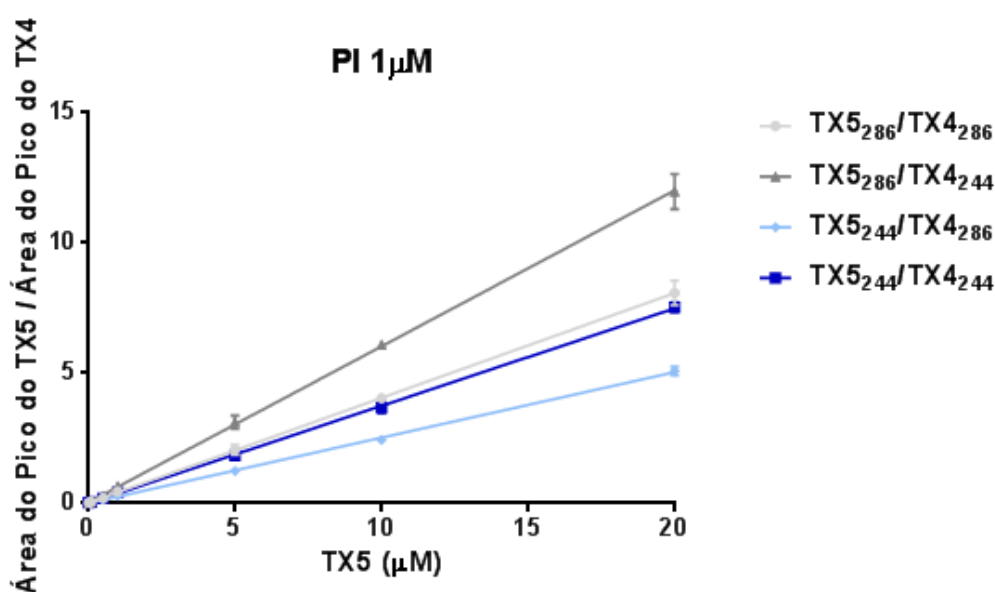
- $\text{TX5}_{286}/\text{TX4}_{286}$
- $\text{TX5}_{286}/\text{TX4}_{244}$
- $\text{TX5}_{244}/\text{TX4}_{286}$
- $\text{TX5}_{244}/\text{TX4}_{244}$

em que TX5_{286} e TX5_{244} corresponde à área dos picos dos fragmentos 286 e 244 (m/z) do TX5, respetivamente, e TX4_{286} e TX4_{244} corresponde à área dos picos dos fragmentos 286 e 244 (m/z) do TX4, respetivamente.

Tal como se pode verificar pela análise da **figura 72**, é possível verificar a existência de uma correlação linear entre a concentração de TX5 e o sinal analítico (razão entre a área do pico da TX5 e a área do pico do PI), na gama de concentrações de TX5 de 0.005 a 20 μM e com utilização de PI 1 μM ($r^2 > 0,99$). Por outro lado, com a utilização de PI 0,1 μM , a correlação linear foi obtida apenas para a gama de concentrações de TX5 de 0.005 a 10 μM (**figura 73**).

Deste modo, assumindo a potencial existência de níveis reduzidos de TX5 ao nível dos estudos de permeabilidade, nomeadamente ao nível basolateral, selecionou-se a concentração de PI de 0,1 μM como a concentração de trabalho a ser adicionada a padrões e amostras no âmbito da quantificação da TX5 nos referidos estudos. Ou seja, utilizou-se a concentração de PI mais reduzida numa tentativa de aproximar a concentração de PI à concentração de analito (TX5) expectável nas amostras recolhidas nos estudos de permeabilidade. Na quantificação dos níveis de TX5 ao nível dos estudos de permeabilidade procedeu-se sempre à adição de PI 0,1 μM a padrões e amostras, tendo sido efetuada, em duplicado, uma curva de calibração de TX5 (0,005 μM a 10 μM) por cada conjunto de amostras sujeitas ao processo extrativo. Consequentemente, a existência de linearidade apenas até uma concentração de TX5 de 10 μM exigiu a

diluição prévia das amostras retiradas da porção apical (com HBSS) uma vez que, nos estudos de permeabilidade, a concentração de exposição testada foi a de 20 μM . Adicionalmente, a quantificação dos níveis basolaterais, apicais e intracelulares de TX5 nas amostras recolhidas nos estudos de permeabilidade foi determinada por interpolação numa curva de calibração que correlaciona a concentração de TX5 (μM) com a razão entre área do pico do fragmento 286 m/z da TX5 e a área do pico do fragmento 286 m/z da TX4 (oTX5₂₈₆/TX4₂₈₆), dado que se tratam dos iões mais abundantes obtidos após ionização e fragmentação de cada derivado tioxantónico.



	TX5 ₂₈₆ /TX4 ₂₈₆	TX5 ₂₈₆ /TX4 ₂₄₄	TX5 ₂₄₄ /TX4 ₂₈₆	TX5 ₂₄₄ /TX4 ₂₄₄
Equation	$Y = 0.4028 * X - 0.003530$	$Y = 0.5995 * X + 0.008951$	$Y = 0.2516 * X - 0.01829$	$Y = 0.3741 * X - 0.01953$

	TX5 ₂₈₆ /TX4 ₂₈₆	TX5 ₂₈₆ /TX4 ₂₄₄	TX5 ₂₄₄ /TX4 ₂₈₆	TX5 ₂₄₄ /TX4 ₂₄₄
R square	0.9957	0.9961	0.9967	0.9978

Figura 72 – Representação gráfica da reta de calibração que relaciona a concentração de TX5 (μM) com a razão do sinal analítico (área do pico) de cada fragmento da TX5 e do PI. Foi testada uma gama de concentrações de TX5 de 0.005 a 20 μM e fixada a concentração de PI (1 μM). Os resultados estão expressos como média \pm SD (em duplicado).

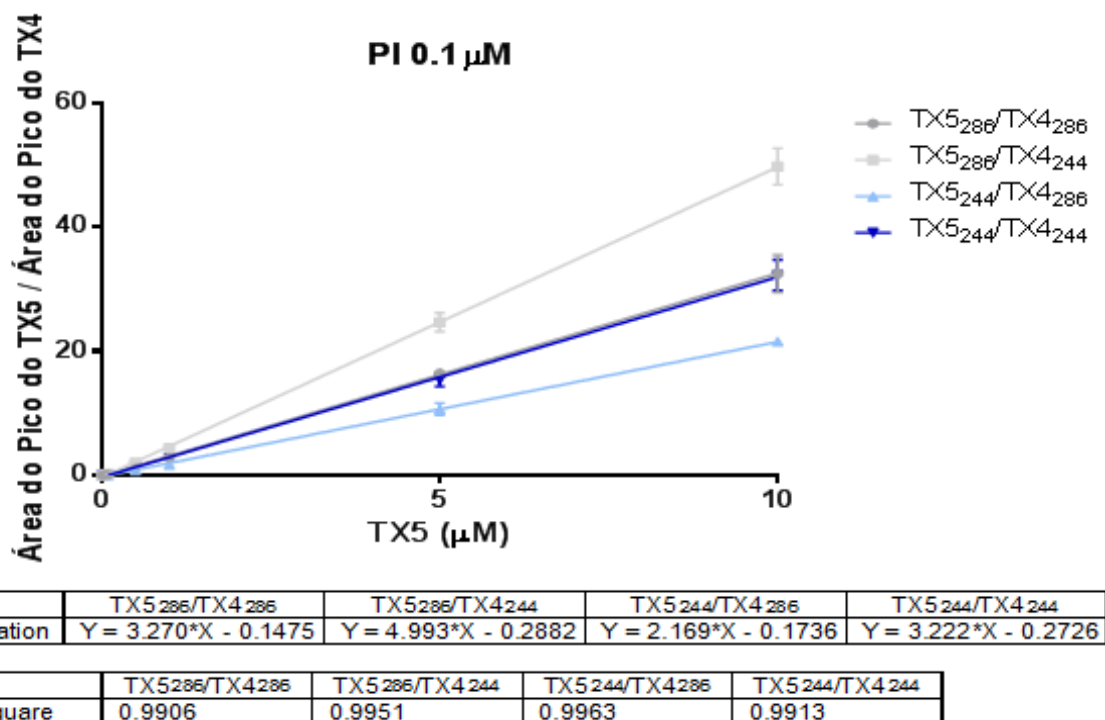


Figura 73 – Representação gráfica da reta de calibração que relaciona a concentração de TX5 (μM) com a razão do sinal analítico (área do pico) de cada fragmento da TX5 e do PI. Foi testada uma gama de concentrações de TX5 de 0.005 – 20 μM e fixada a concentração de PI (0.1 μM). Os resultados estão expressos como média \pm SD (em duplicado). A linearidade foi apenas observada para a gama de concentrações de 0,005 a 10 μM .

9.3 Avaliação da Permeabilidade da TX5

Estudos anteriores demonstraram a capacidade da TX5 em causar a indução/ativação da P-gp em células Caco-2, resultando numa significativa proteção contra a citotoxicidade induzida por um substrato tóxico da P-gp, o paraquato (PQ) (Silva, Sousa et al. 2014). *In vivo*, a via antidotal de indução da P-gp foi igualmente proposta com sucesso como uma nova abordagem terapêutica para intoxicações por PQ. Com efeito, demonstrou-se que uma única dose de dexametasona (100 mg/kg ip) causava uma indução significativa da síntese *de novo* da P-gp ao nível pulmonar em ratos tratados com o herbicida (25 mg / kg ip) 2 h antes do tratamento com dexametasona (um conhecido indutor da P-gp), reduzindo em cerca de 40% a acumulação pulmonar de PQ e aumentando em 50% a taxa de sobrevivência dos animais (Dinis-Oliveira, Duarte et al. 2006). Foi igualmente possível observar uma diminuição da absorção intestinal e um aumento da excreção intestinal do PQ, como consequência da síntese *de novo* da P-gp induzida pela dexametasona ao nível dos enterócitos e da membrana canalicular dos hepatócitos (Dinis-Oliveira, Duarte et al. 2006, Dinis-Oliveira, Remiao et al. 2006).

Adicionalmente, estudos *in vivo* realizados no laboratório de toxicologia demonstraram que a administração simultânea de TX5 (30 mg/Kg) e digoxina (0,25 mg/Kg), por vial oral, a ratos Wistar resultou numa alteração significativa da farmacocinética deste substrato modelo da P-gp, com uma significativa redução da área sob a curva da digoxina, comparativamente com os ratos aos quais foi administrado apenas o digitálico (Ferreira 2014).

No caso de substratos tóxicos da P-gp como o PQ, o papel da P-gp pode ser particularmente importante a nível intestinal, limitando a sua absorção ao nível dos enterócitos, e o correspondente acesso aos órgãos alvo. No entanto, o efeito indutor deste derivado tioxantónico pode ser igualmente importante no aumento da expressão e atividade da P-gp ao nível dos próprios órgãos alvo. Deste modo, no presente trabalho experimental, pretendeu-se avaliar a permeabilidade da TX5 e, consequentemente, o seu potencial acesso aos órgãos onde poderá ser útil o mecanismo de indução/acivação da P-gp como potencial via antidotal contra a toxicidade de substratos da P-gp. Para o efeito, utilizaram-se duas linhas celulares diferentes, as células Caco-2, modelo *in vitro* representativo da barreira intestinal humana, e as células RBE4, modelo *in vitro* representativo da barreira hematoencefálica (BHE) de rato.

9.3.1 Níveis basolaterais de TX5

Na avaliação da permeabilidade da TX5 foram realizadas quatro experiências independentes, em triplicado (3 inserts/experiência), utilizando monocamadas íntegras de células Caco-2 e de células RBE4. Nestes estudos, foram recolhidas amostras de HBSS da porção basolateral do *insert* ao longo de um período de 8h. A cada tempo de colheita, após a recolha de 200 µL do meio presente na zona basolateral, procedeu-se à sua substituição com 200 µL HBSS isento de TX5. No final das 8 h do ensaio de permeabilidade, além do HBSS presente na porção basolateral, foi igualmente recolhido o HBSS presente na porção apical, assim como a monocamada de células.

No caso das células Caco-2, dos doze *inserts* utilizados nas quatro experiências independentes, foi apenas possível detectar e quantificar a TX5 em 4 dos *inserts* utilizados, e apenas no final do estudo, ou seja, 8 h após a adição da TX5 na porção apical do *insert*. Tal como se pode observar pela análise da **figura 74**, não foi possível, nas condições do ensaio, detectar e quantificar a presença de TX5 na porção basolateral da monocamada de células Caco-2, até às 7 h após o início dos ensaios de permeabilidade. No caso dos *inserts* onde foi possível detectar e quantificar a TX5 ao nível basolateral, foi igualmente quantificado o TX5 remanescente na porção apical, 8h após o início do ensaio. Os níveis basolaterais de TX5 foram então quantificados e

expressos em % da quantidade detetada ao nível apical (**figura 75**). Tal como ilustrado na figura y, 8h após o início dos estudos de permeabilidade, os níveis basolaterais de TX5 foram extremamente reduzidos, representado apenas 1,87 % dos níveis apicais de derivado tioxantónico. Deste modo, se demonstra a reduzida permeabilidade deste composto, prevendo uma reduzida absorção intestinal do mesmo.

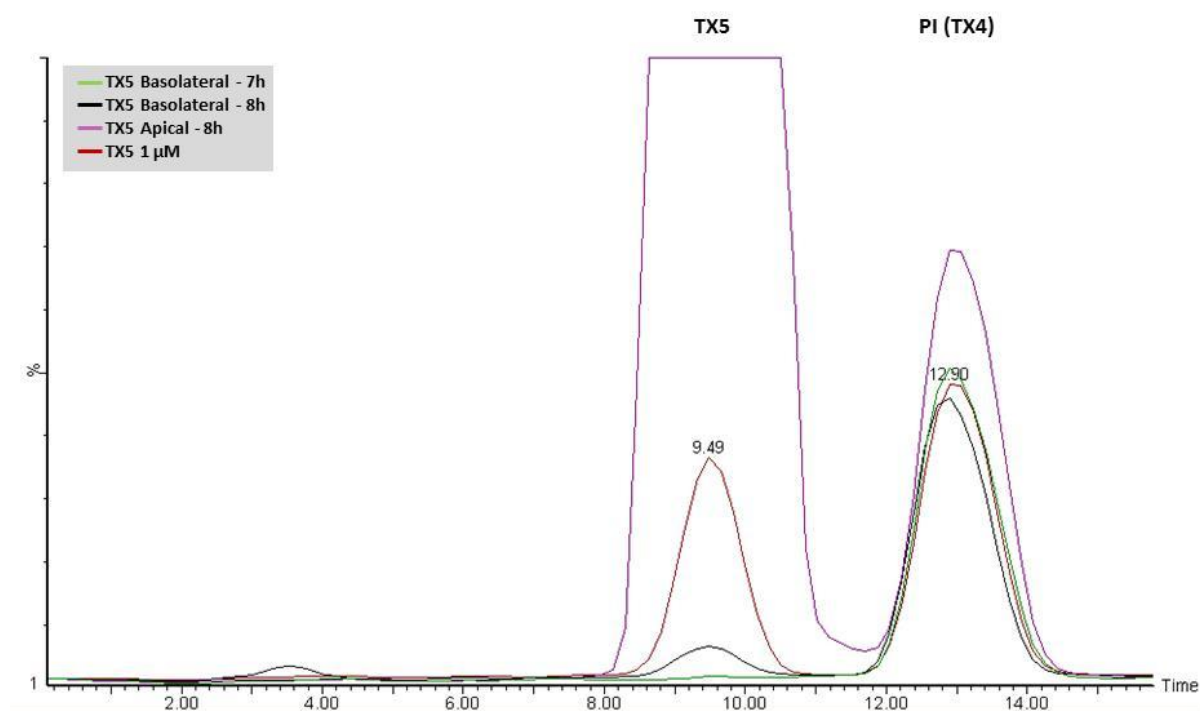


Figura 74 – Cromatograma ilustrativo da análise e quantificação da TX5 em amostras de HBSS recolhidas nos estudos de avaliação da permeabilidade da TX5 usando monocamadas de células Caco-2.

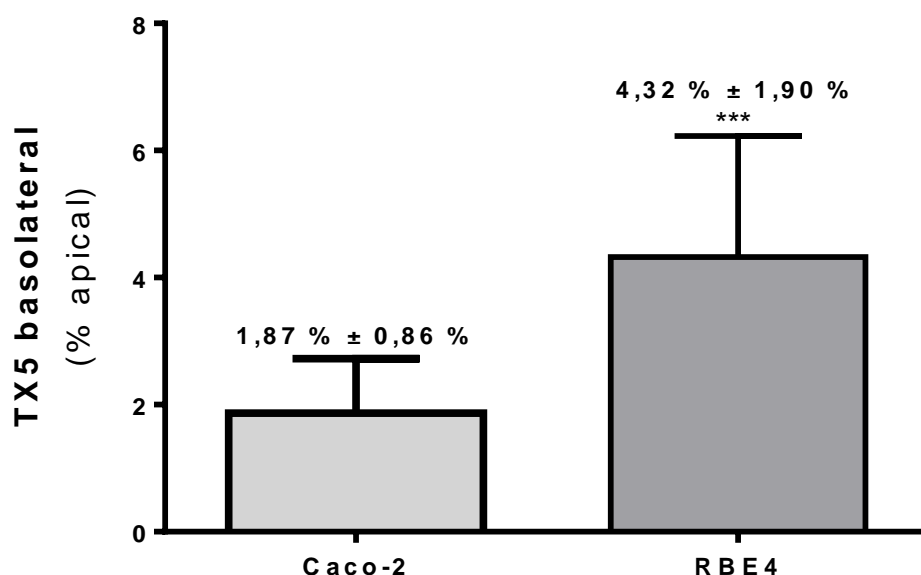


Figura 75 – Níveis de TX5 detetados nos estudos de permeabilidade com monocamadas de células Caco-2 e Rbe4, ao nível da porção basolateral dos *inserts*. Os resultados estão expressos como média \pm SD de 4 experiências independentes (em triplicado). No caso das células Caco-2, foi efetuada a deteção e quantificação da TX5 em 4 dos 12 *inserts* utilizados, enquanto que nos estudos de permeabilidade com células RBE4 foi possível detetar e quantificar a TX5 em 8 dos 12 *inserts* utilizados. A comparação estatística foi efetuada com o *Unpaired t test* (** $p < 0,001$ vs. células Caco-2).

Nos estudos de permeabilidade realizados com o modelo *in vitro* da BHE de rato, as células RBE4, foi possível detetar e quantificar a TX5 em 8 dos 12 *inserts* utilizados, 8 h após a adição da TX5 na porção apical do *insert*. Contudo, como se pode observar na **figura 76**, e à semelhança dos resultados obtidos com as células Caco-2, não foi possível, nas condições do ensaio, detetar e quantificar a presença de TX5 na porção basolateral da monocamada de células RBE4, até às 7 h após o início dos ensaios de permeabilidade. Tal como efetuado nos estudos com o modelo *in vitro* da barreira intestinal humana, os níveis basolaterais de TX5 foram quantificados e expressos como % da quantidade detetada ao nível apical (**figura 75**). Foi possível observar que os níveis basolaterais de TX5 nos estudos de permeabilidade realizados com as células RBE4 foram significativamente superiores aos níveis detetados nos estudos efetuados com as células Caco-2. Contudo, apesar de significativamente diferentes, os níveis detetados representam apenas 4,32% dos níveis detetados ao nível apical, demonstrando a reduzida permeabilidade deste composto ao nível da BHE.

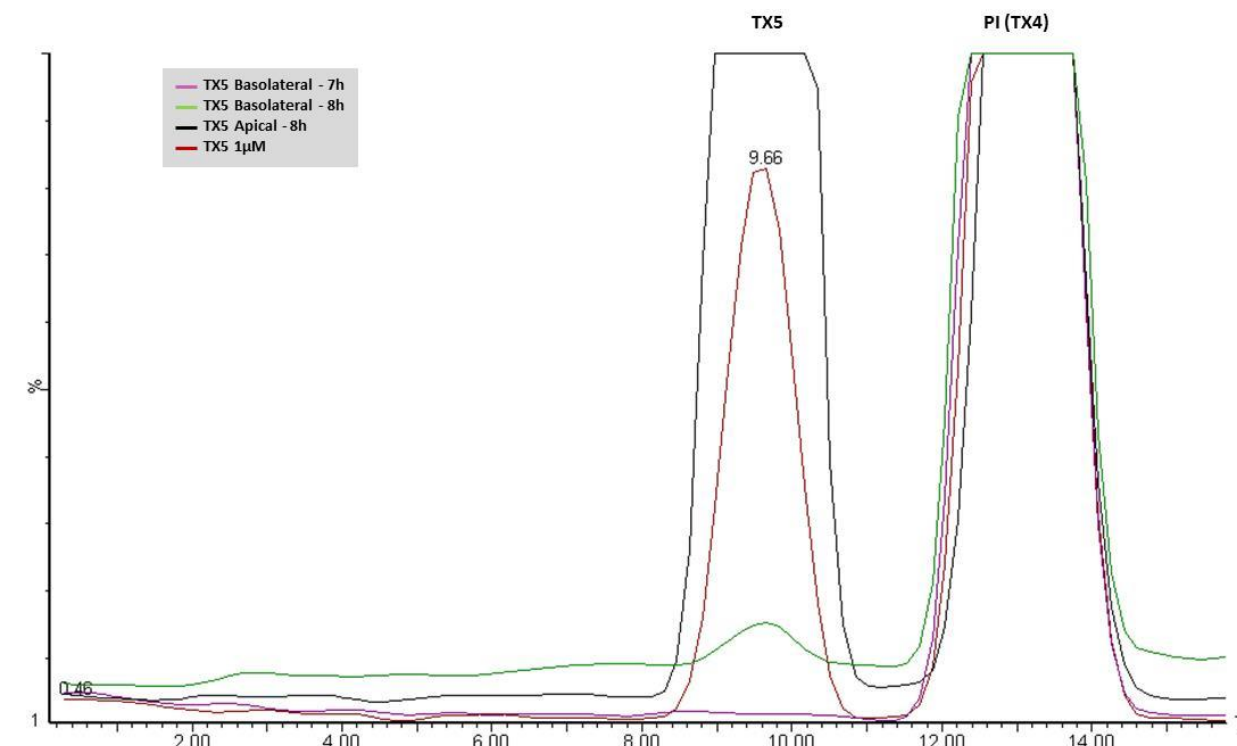


Figura 76 – Cromatograma ilustrativo da análise e quantificação da TX5 em amostras de HBSS recolhidas nos estudos de avaliação da permeabilidade da TX5 usando monocamadas de células RBE4.

9.3.2 Níveis intracelulares de TX5

Conforme referido anteriormente, além da quantificação dos níveis basolaterais de TX5, que permitiram avaliar a permeabilidade da TX5 através da monocamada de células Caco-2 e RBE4, foram igualmente quantificados os níveis intracelulares de TX5 em ambos os modelos celulares. Com esta determinação dos níveis intracelulares do derivado tioxantónico pretendeu-se aferir a capacidade do composto ficar retido no interior das células e, assim, poder causar a indução/ativação da P-gp, em primeiro lugar, nas próprias células de tecidos barreira como o epitélio intestinal e a BHE.

Como é possível verificar pela análise da **figura 77**, os níveis intracelulares de TX5 (nmol/mg de proteína), 8 horas após exposição ao derivado tioxantónico, foram significativamente superiores nas células RBE4 ($325,58 \pm 94,83$ nmol/mg proteína), quando comparados com os níveis intracelulares de TX5 detetados nas células Caco-2 ($28,51 \pm 6,04$ nmol/mg proteína). Adicionalmente, quando expressos em termos de percentagem de TX5 quantificada a nível apical, 8h após exposição, foi igualmente possível verificar uma maior percentagem de TX5 intracelular nas células RBE4, comparativamente com percentagem detetada nas células Caco-2, demonstrando uma maior capacidade das células RBE4 em reter esta tioxantona. De facto, nas células RBE4 os níveis de TX5 intracelular representaram 34,32 % dos níveis detetados a nível apical,

enquanto nas células Caco-2 os níveis intracelulares representaram apenas 17,15 % dos níveis apicais de TX5 (**figura 78**).

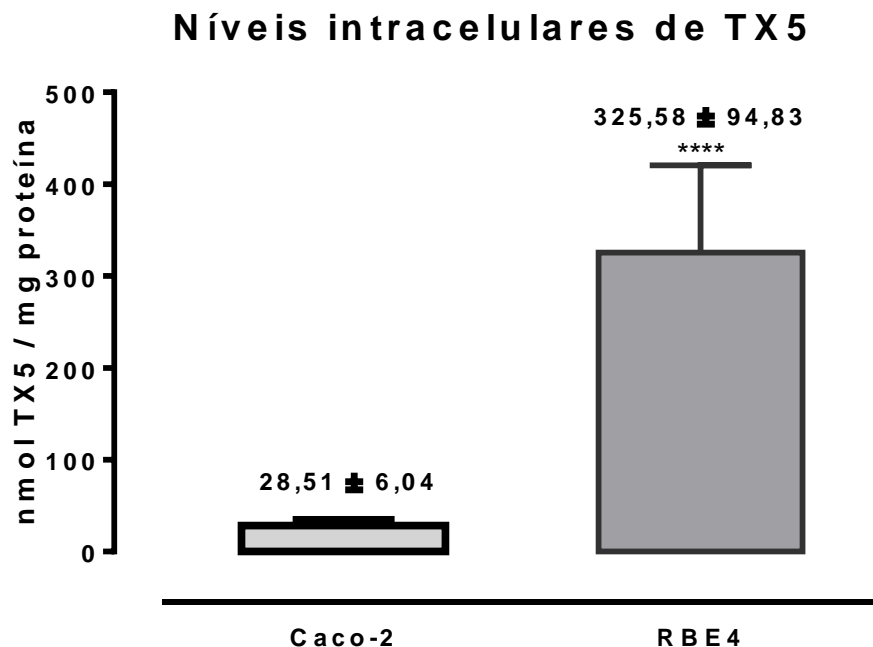


Figura 77 – Níveis intracelulares de TX5 (nmol/mg proteína) em células Caco-2 e células RBE4, 8h após exposição a TX5 20 μ M. As células foram semeadas em *inserts* e expostas ao TX5 na parte apical da monocamada. Os resultados estão expressos como média \pm SD de 4 experiências independentes (em triplicado). A comparação estatística foi efetuada com o *Unpaired t test* (**** $p < 0,0001$ vs. células Caco-2).

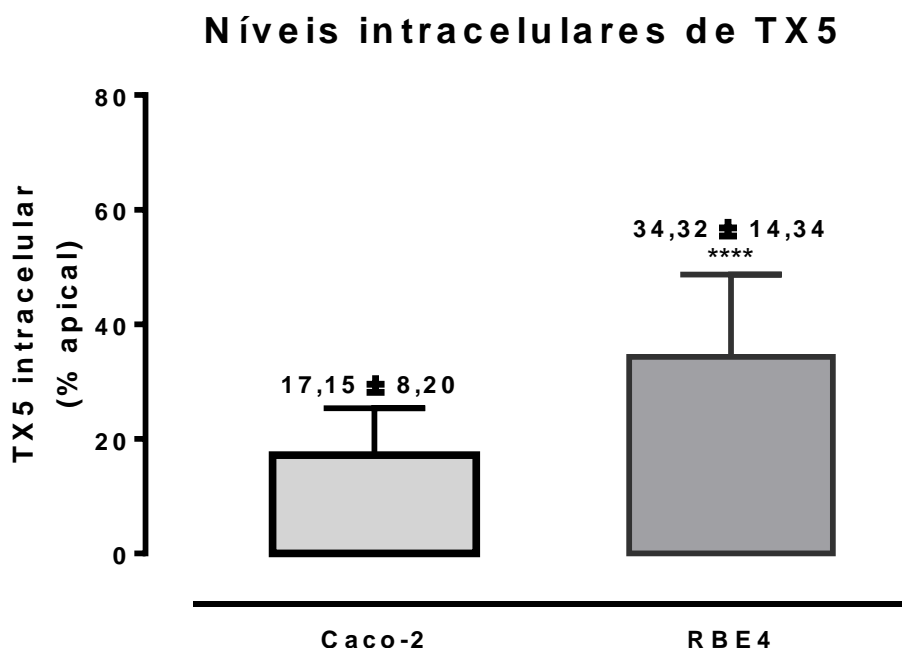


Figura 78 – Níveis intracelulares de TX5 em células Caco-2 e células RBE4, 8h após exposição a TX5 20 μ M, expressos em percentagem dos níveis detetados a nível apical. As células foram semeadas em *inserts* e expostas ao TX5 na parte apical do poço. Os resultados estão expressos como média \pm SD de 4 experiências independentes (em triplicado). A comparação estatística foi efetuada com o *Unpaired t test* (**** $p < 0,0001$ vs. células Caco-2).

Dado que, em ambos os modelos celulares, a permeabilidade da TX5 foi extremamente reduzida (< 5% da TX5 apical foi detetada ao nível basolateral), as diferenças significativas encontradas entres estas duas linhas celulares relativamente aos níveis intracelulares de TX5 podem dever-se a diferenças ao nível dos transportadores presentes na membrana apical das células e que fazem o *uptake* da TX5 para o meio intracelular, ou a diferenças nos transportadores de efluxo presentes igualmente na membrana apical, tal, como a P-gp, que fazem o efluxo da TX5 de novo para meio apical da monocamada celular.

Tal como referido anteriormente, a TX5 demonstrou induzir significativamente a expressão e atividade da P-gp em células Caco-2, 24 h após exposição (Silva, Sousa et al. 2014). No mesmo estudo, foi avaliada a atividade ATPásica da P-gp na presença de TX5 (20 μ M), usando vesículas membranares purificadas de inseto contendo P-gp humana (vesículas membranares MDR1-Sf9) (Silva, Sousa et al. 2014). Os ensaios de avaliação da atividade ATPásica da P-gp têm sido muito utilizados para avaliar possíveis interações de compostos com a função da P-gp, sendo que os compostos que atuam como substratos desta bomba de efluxo normalmente estimulam a sua atividade ATPásica (Ambudkar, Dey et al. 1999). De facto, os resultados obtidos mostraram que a

TX5 provocou um aumento significativo na atividade ATPásica da P-gp, demonstrando que este derivado tioxanóico é, assim, ativamente transportado por esta bomba de efluxo (Silva, Sousa et al. 2014). Deste modo, sendo a TX5 um substrato da P-gp, as diferenças observadas nos níveis intracelulares deste derivado tioxantónico podem dever-se a diferenças entre as duas linhas celulares em termos de níveis de expressão da P-gp. Apesar de a TX5 ter demonstrado ser um ativador da P-gp em ambas as linhas celulares, o seu potencial indutor foi, até ao momento, apenas demonstrado nas células Caco-2, e apenas 24 h após exposição. A ativação da P-gp é normalmente um processo rápido e particularmente importante na presença de dois substratos da P-gp, em que a ligação de um num determinado local da proteína potencia o transporte de um segundo composto ligado num local distinto. Neste caso específico, dada a exposição das células a um único composto (TX5), as diferenças observadas podem dever-se a diferenças nos níveis basais de expressão da P-gp, ou a uma diferente potência no que respeita ao efeito indutor da P-gp deste composto nas duas linhas celulares. Assim, no futuro, pretende-se avaliar o efeito indutor da TX5 nas células Caco-2 e RBE4 8h após exposição, com o objetivo de perceber se os níveis intracelulares significativamente reduzidos encontrados nas células Caco-2 se devem a um maior efeito indutor do derivado tioxantónico, resultando num aumento mais significativo da expressão da P-gp e, consequentemente, num aumento significativo do seu próprio efluxo.

Por último, estudos prévios evidenciam diferenças na estrutura e atividade da P-gp dependendo do modelo animal, indicando diferenças interespecies importantes (Xia, Xiao et al. 2006, Pan and Aller 2015) . Deste modo, a tioxantona pode ligar-se de forma distinta à P-gp humana e à P-gp de rato, com diferenças em termos de força e afinidade de ligação. Esta ligação diferencial pode dever-se a diferenças estruturais na proteína entre as duas espécies, as quais podem explicar a discrepância de resultados obtidos no que diz respeito à concentração intracelular de TX5 nas células RBE4 e nas células Caco-2. Adicionalmente, considerando o potencial efeito indutor deste derivado tioxantónico, e dado que os modelos *in vitro* utilizados, as células Caco-2 e as células RBE4, representam duas espécies diferentes, é igualmente necessário considerar a potencial existência de diferenças interespecies no que respeita às vias de regulação da expressão e atividade da P-gp, particularmente nos locais de ligação dos substratos e nos perfis de ativação de recetores nucleares órfãos que regulam a expressão da proteína (Wang and LeCluyse 2003). Assim, não é possível garantir que o mecanismo pelo qual a tioxantona regula a expressão da P-gp nas Caco-2 seja ativado nas células RBE4.

Em conclusão, a diferença observada nos níveis intracelulares de TX5 nas duas linhas celulares pode dever-se a uma maior quantidade de P-gp nas células Caco-2 ao nível apical, a qual efectua o efluxo de uma maior quantidade de TX5 novamente para a zona apical, ou a diferenças entre as células Caco-2 e as células RBE4 no que respeita aos transportadores responsáveis pelo influxo da TX5 com uma potencial maior expressão desses transportadores, ou uma maior afinidade dos mesmos para a TX5, nas células RBE4, resultando na incorporação de níveis superiores de TX5 nesta linha celular.

Por último, de salientar que, apesar da reduzida permeabilidade da TX5, os níveis encontrados ao nível intracelular poderão ser suficientes para garantir o efeito indutor/ativador pretendido com a utilização deste derivado tioxantónico. Esta reduzida permeabilidade pode ser particularmente importante ao nível intestinal, em que a administração da TX5 por via oral poderá permitir uma eficaz ação indutora/ativadora da P-gp localmente ao nível dos enterócitos, resultando numa potencial redução da absorção do substrato tóxico da P-gp e, consequentemente, num potencial aumento da sua excreção. Como resultado, a reduzida absorção do derivado tioxantónico irá diminuir a probabilidade de ocorrência de efeitos adversos sistémicos, assim como a probabilidade de interações farmacocinéticas com outros fármacos administrados em simultâneo num cenário de intoxicação real.

Parte V

Conclusões

10. Conclusões

A P-gp, transportador pertencente à família dos transportadores ABC, encontra-se presente na maioria dos órgãos sendo por isso considerado um transportador importante a nível terapêutico, dado que realiza o efluxo de vários xenobióticos, entre os quais tóxicos e fármacos. Até à data, foram realizados vários estudos que permitiram demonstrar que a indução deste transportador, reduz efetivamente a toxicidade de substratos da P-gp, através da regulação da sua expressão e/ou atividade.

Um grupo de potenciais indutores da atividade e expressão da P-gp é o grupo das tioxantonas, que demonstrou, em estudos anteriores, apresentar diversos compostos com a capacidade de aumentar significativamente atividade e expressão da P-gp, resultando numa significativa proteção de células Caco-2 contra a toxicidade induzida pelo PQ, um substrato tóxico da P-gp.

No presente trabalho foi estudado em específico a TX5, derivado tioxantónico que apresenta um grande potencial para induzir a expressão e atividade da P-gp. Procedeu-se, assim, à exposição de duas linhas celulares distintas, as células Caco-2 e RBE4, que mimetizam as características da barreira intestinal humana e da BHE, respetivamente, à TX5 e nas quais se avaliou a citotoxicidade e a capacidade deste composto atravessar as barreiras biológicas.

A partir deste trabalho foi possível concluir que:

- A TX5 não provoca citotoxicidade na linha celular Caco-2 quando exposta durante 24 horas nas concentrações 0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M e 100 μ M;
- A TX5 não provoca citotoxicidade na linha celular RBE4 quando exposta durante 8 horas nas concentrações 10 μ M e 20 μ M;
- Nos estudos de permeabilidade, apenas após 8 horas de ensaio foi possível detetar e quantificar a presença de TX5 na porção basolateral;

- Nos estudos de permeabilidade, verificou-se que os níveis intracelulares de TX5 quantificados nas células RBE4 são muito superiores aos níveis intracelulares quantificados nas células Caco-2. Esta diferença prende-se pelo facto de:
 - Poder existir uma maior expressão de P-gp nas células Caco-2 do que nas RBE4, realizando assim um maior efluxo de composto novamente para a zona apical;
 - Existirem diferenças de afinidade da P-gp para a TX5 nas duas linhas celulares estudadas, por serem de diferentes tecidos, ou por serem de diferentes espécies;
 - Diferenças entre transportadores responsáveis pelo influxo da TX5 nas células Caco-2 e RBE4, estando mais expressos ou tendo mais afinidade para a TX5 nas células RBE4, resultando em níveis superiores de TX5 nesta linha celular;
- Tanto nas células Caco-2 como nas células RBE4 os níveis basolaterais de TX5 foram muito reduzidos, indicando, assim, uma reduzida permeabilidade do derivado tioxantónico e, consequentemente, a sua reduzida absorção. Apesar de a permeabilidade da TX5 ser reduzida em ambas as linhas celulares, do ponto de vista clínico estas concentrações poderão ser suficientes para garantir o efeito indutor/ativador pretendido, principalmente a nível intestinal, onde a TX5 poderá atuar nos enterócitos e assim reduzir a absorção de um determinado substrato tóxico, e consequentemente, aumentar a sua excreção, reduzindo a sua toxicidade. A sua ação local ao nível dos enterócitos resultará numa potencial redução de efeitos adversos sistémicos e/ou redução de potenciais interações farmacocinéticas decorrentes da administração concomitante de outros fármacos;

- Neste trabalho foi também desenvolvido um método para extração, análise e quantificação da TX5 por LC-MS/MS. No âmbito desse desenvolvimento foi possível:
- Optimizar as condições cromatográficas para a análise e quantificação destes compostos, definindo-se como fase móvel a mistura constituída por 5% água + 95% metanol, com acetato de amónio 5 mM. Foi efetuada uma eluição em modo isocrático a um fluxo de 0,4 mL/min;
 - Obter os espetros de massas da TX5 e da TX4 - a fragmentação da TX5 e TX4 origina, no detetor de massas, dois fragmentos maioritários idênticos para cada composto: iões 244 e 286 m/z. O equipamento foi operado no modo de ionização ESI+ (electrospray positivo) e, o ião molecular pesquisado foi o ião $[M+H]^+$, com uma razão m/z de 328 e 342 para o TX5 e TX4, respetivamente;
 - Optimizar as condições do detetor de massas para a obtenção de um sinal analítico de maior intensidade para os dois fragmentos maioritários da TX5 e da TX4;
 - Desenvolver um método de extração com acetato de etilo que permite obter um rendimento extrativo excelente e idêntico para a TX5 e a TX4;
 - Definir que a TX4 poderá ser utilizada com sucesso como padrão interno, dado o comportamento cromatográfico idêntico e a eficiente separação da TX5, além de apresentar um rendimento extrativo semelhante à TX5.

Dada a potencial relevância e utilidade da metodologia de LC-MS/MS desenvolvida, esta será, no futuro, validada no que respeita a diversos parâmetros, nomeadamente, precisão, exactidão, seletividade, limite de quantificação e limite de deteção.

Parte VI

Referências Bibliográficas

11.Referências Bibliográficas

- Abbott, N. J. (2002). "Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability." J Anat **200**(6): 629-638.
- Ambudkar, S. V., S. Dey, C. A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan and M. M. Gottesman (1999). "Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter." Annu Rev Pharmacol Toxicol **39**: 361-398.
- Ambudkar, S. V., I. W. Kim and Z. E. Sauna (2006). "The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1)." Eur J Pharm Sci **27**(5): 392-400.
- Amin, M. L. (2013). "P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery." Drug Target Insights **7**: 27-34.
- Anika Hartz, B. B. (2010). "Regulation of ABC Transporters at the Blood-Brain Barrier: New Targets for CNS Therapy." Molecular Interventions **10**(5): 12.
- Anne T. Nies, M. R., and Dietrich Keppler (2007). Multidrug Resistance Proteins of the ABCC Subfamily, Hoboken, N.J. : Wiley-Interscience, c2007.: 55.
- Artursson, P. (1990). "Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells." J Pharm Sci **79**(6): 476-482.
- Artursson, P. and J. Karlsson (1991). "Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells." Biochem Biophys Res Commun **175**(3): 880-885.
- Ayman, E.-K. and V. Manthena (2012). Oral Absorption, Intestinal Metabolism and Human Oral Bioavailability.
- Azzi, G., J. F. Bernaudin, C. Bouchaud, B. Bellon and J. Fleury-Feith (1990). "Permeability of the normal rat brain, spinal cord and dorsal root ganglia microcirculations to immunoglobulins G." Biol Cell **68**(1): 31-36.
- Baguley, B. C. (2002). "Novel strategies for overcoming multidrug resistance in cancer." BioDrugs **16**(2): 97-103.
- Bain, L. J., J. B. McLachlan and G. A. LeBlanc (1997). "Structure-activity relationships for xenobiotic transport substrates and inhibitory ligands of P-glycoprotein." Environ Health Perspect **105**(8): 812-818.
- Balbuena, P., W. Li, G. Magnin-Bissel, J. B. Meldrum and M. Ehrich (2010). "Comparison of two blood-brain barrier in vitro systems: cytotoxicity and transfer assessments of malathion/oxon and lead acetate." Toxicol Sci **114**(2): 260-271.

- Barakat, S., S. Turcotte, M. Demeule, M. P. Lachambre, A. Regina, L. G. Baggetto and R. Beliveau (2008). "Regulation of brain endothelial cells migration and angiogenesis by P-glycoprotein/caveolin-1 interaction." Biochem Biophys Res Commun **372**(3): 440-446.
- Batrakova, E. V., D. W. Miller, S. Li, V. Y. Alakhov, A. V. Kabanov and W. F. Elmquist (2001). "Pluronic P85 enhances the delivery of digoxin to the brain: in vitro and in vivo studies." J Pharmacol Exp Ther **296**(2): 551-557.
- Beaulieu, E., M. Demeule, L. Ghitescu and R. Beliveau (1997). "P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain." Biochem J **326 (Pt 2)**: 539-544.
- Beck, K., K. Hayashi, K. Dang, M. Hayashi and C. D. Boyd (2005). "Analysis of ABCC6 (MRP6) in normal human tissues." Histochem Cell Biol **123**(4-5): 517-528.
- Begley, D. J. (2004). "ABC transporters and the blood-brain barrier." Curr Pharm Des **10**(12): 1295-1312.
- Begley, D. J. and M. W. Brightman (2003). "Structural and functional aspects of the blood-brain barrier." Prog Drug Res **61**: 39-78.
- Belpomme, D., S. Gauthier, E. Pujade-Lauraine, T. Facchini, M. J. Goudier, I. Krakowski, G. Netter-Pinon, M. Frenay, C. Gousset, F. N. Marie, M. Benmiloud and F. Sturtz (2000). "Verapamil increases the survival of patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma." Ann Oncol **11**(11): 1471-1476.
- Benet, L. Z. and C. L. Cummins (2001). "The drug efflux-metabolism alliance: biochemical aspects." Adv Drug Deliv Rev **50 Suppl 1**: S3-11.
- Benet, L. Z., C. L. Cummins and C. Y. Wu (2004). "Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes." Int J Pharm **277**(1-2): 3-9.
- Benet, L. Z., T. Izumi, Y. Zhang, J. A. Silverman and V. J. Wachter (1999). "Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery." J Control Release **62**(1-2): 25-31.
- Borst, P. and R. O. Elferink (2002). "Mammalian ABC transporters in health and disease." Annu Rev Biochem **71**: 537-592.
- Bortfeld, M., M. Rius, J. König, C. Herold-Mende, A. T. Nies and D. Keppler (2006). "Human multidrug resistance protein 8 (MRP8/ABCC11), an apical efflux pump for steroid sulfates, is an axonal protein of the CNS and peripheral nervous system." Neuroscience **137**(4): 1247-1257.
- Busch, A. E., U. Karbach, D. Miska, V. Gorboulev, A. Akhoundova, C. Volk, P. Arndt, J. C. Ulzheimer, M. S. Sonders, C. Baumann, S. Waldegger, F. Lang and H. Koepsell (1998). "Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine." Mol Pharmacol **54**(2): 342-352.

- Butt, A. M., H. C. Jones and N. J. Abbott (1990). "Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study." *The Journal of Physiology* **429**: 47-62.
- Callaghan, R., F. Luk and M. Bebawy (2014). "Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein: time for a change of strategy?" *Drug Metab Dispos* **42**(4): 623-631.
- Callen, D. F., E. Baker, R. N. Simmers, R. Seshadri and I. B. Roninson (1987). "Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1." *Hum Genet* **77**(2): 142-144.
- Cecchelli, R., B. Dehouck, L. Descamps, L. Fenart, V. V. Buee-Scherrer, C. Duhem, S. Lundquist, M. Rentfel, G. Torpier and M. P. Dehouck (1999). "In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier." *Adv Drug Deliv Rev* **36**(2-3): 165-178.
- Chaudhary, P. M. and I. B. Roninson (1991). "Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells." *Cell* **66**(1): 85-94.
- Chaudhary, P. M. and I. B. Roninson (1993). "Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs." *J Natl Cancer Inst* **85**(8): 632-639.
- Chin, J. E., R. Soffir, K. E. Noonan, K. Choi and I. B. Roninson (1989). "Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family." *Mol Cell Biol* **9**(9): 3808-3820.
- Choudhuri, S., N. J. Cherrington, N. Li and C. D. Klaassen (2003). "Constitutive expression of various xenobiotic and endobiotic transporter mRNAs in the choroid plexus of rats." *Drug Metab Dispos* **31**(11): 1337-1345.
- Choudhuri, S. and C. D. Klaassen (2006). "Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters." *Int J Toxicol* **25**(4): 231-259.
- Christians, U. (2004). "Transport proteins and intestinal metabolism: P-glycoprotein and cytochrome P4503A." *Ther Drug Monit* **26**(2): 104-106.
- Chu, X. Y., J. R. Strauss, M. A. Mariano, J. Li, D. J. Newton, X. Cai, R. W. Wang, J. Yabut, D. P. Hartley, D. C. Evans and R. Evers (2006). "Characterization of mice lacking the multidrug resistance protein MRP2 (ABCC2)." *J Pharmacol Exp Ther* **317**(2): 579-589.
- Colabufo, N. A., F. Berardi, M. Contino, M. Niso and R. Perrone (2009). "ABC pumps and their role in active drug transport." *Curr Top Med Chem* **9**(2): 119-129.
- Collett, A., N. B. Higgs, E. Sims, M. Rowland and G. Warhurst (1999). "Modulation of the permeability of H₂ receptor antagonists cimetidine and ranitidine by P-glycoprotein in rat intestine and the human colonic cell line Caco-2." *J Pharmacol Exp Ther* **288**(1): 171-178.
- Committee, H. G. N. "Gene Family: ATP binding cassette transporters (ABC)." from <http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/417>.

- Couraoud, P.-O., J. Greenwood, F. Roux and P. Adamson (2003). Development and Characterization of Immortalized Cerebral Endothelial Cell Lines. The Blood-Brain Barrier. S. Nag, Humana Press. **89**: 349-364.
- Couture, L., J. A. Nash and J. Turgeon (2006). "The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: a special look at the heart." Pharmacol Rev **58**(2): 244-258.
- Coy, D. J. (2012). "PHYSIOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL ROLES OF ABC TRANSPORTERS IN CELLULAR EFFLUX OF SUBSTRATES " Theses and Dissertations--Toxicology and Cancer Biology **4**.
- Cummins, C. L., W. Jacobsen and L. Z. Benet (2002). "Unmasking the dynamic interplay between intestinal P-glycoprotein and CYP3A4." J Pharmacol Exp Ther **300**(3): 1036-1045.
- Dallas, S., D. S. Miller and R. Bendayan (2006). "Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system." Pharmacol Rev **58**(2): 140-161.
- de Lannoy, I. A. and M. Silverman (1992). "The MDR1 gene product, P-glycoprotein, mediates the transport of the cardiac glycoside, digoxin." Biochem Biophys Res Commun **189**(1): 551-557.
- Dean, M. and T. Annilo (2005). "Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates." Annu Rev Genomics Hum Genet **6**: 123-142.
- Dean, M., A. Rzhetsky and R. Allikmets (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." Genome Res **11**(7): 1156-1166.
- Decleves, X., A. Fajac, J. Lehmann-Che, M. Tardy, C. Mercier, I. Hurbain, J. L. Laplanche, J. F. Bernaudin and J. M. Scherrmann (2002). "Molecular and functional MDR1-Pgp and MRPs expression in human glioblastoma multiforme cell lines." Int J Cancer **98**(2): 173-180.
- Deeley, R. G., C. Westlake and S. P. Cole (2006). "Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins." Physiol Rev **86**(3): 849-899.
- DeGorter, M. K., C. Q. Xia, J. J. Yang and R. B. Kim (2012). "Drug transporters in drug efficacy and toxicity." Annu Rev Pharmacol Toxicol **52**: 249-273.
- Dietrich, C. G., D. R. de Waart, R. Ottenhoff, A. H. Bootsma, A. H. van Gennip and R. P. Elferink (2001). "Mrp2-deficiency in the rat impairs biliary and intestinal excretion and influences metabolism and disposition of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo." Carcinogenesis **22**(5): 805-811.
- Dietrich, C. G., D. R. de Waart, R. Ottenhoff, I. G. Schoots and R. P. Elferink (2001). "Increased bioavailability of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in MRP2-deficient rats." Mol Pharmacol **59**(5): 974-980.
- Dietrich, C. G., A. Geier and R. P. Oude Elferink (2003). "ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut." Gut **52**(12): 1788-1795.

- Dinis-Oliveira, R. J., J. A. Duarte, F. Remiao, A. Sanchez-Navarro, M. L. Bastos and F. Carvalho (2006). "Single high dose dexamethasone treatment decreases the pathological score and increases the survival rate of paraquat-intoxicated rats." Toxicology **227**(1-2): 73-85.
- Dinis-Oliveira, R. J., F. Remiao, J. A. Duarte, R. Ferreira, A. Sanchez Navarro, M. L. Bastos and F. Carvalho (2006). "P-glycoprotein induction: an antidotal pathway for paraquat-induced lung toxicity." Free Radic Biol Med **41**(8): 1213-1224.
- Dinis-Oliveira, R. J., A. Sarmiento, P. Reis, A. Amaro, F. Remiao, M. L. Bastos and F. Carvalho (2006). "Acute paraquat poisoning: report of a survival case following intake of a potential lethal dose." Pediatr Emerg Care **22**(7): 537-540.
- Doring, B. and E. Petzinger (2014). "Phase 0 and phase III transport in various organs: combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism." Drug Metab Rev **46**(3): 261-282.
- Dresser, G. K., D. G. Bailey, B. F. Leake, U. I. Schwarz, P. A. Dawson, D. J. Freeman and R. B. Kim (2002). "Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine." Clin Pharmacol Ther **71**(1): 11-20.
- Dresser, G. K., U. I. Schwarz, G. R. Wilkinson and R. B. Kim (2003). "Coordinate induction of both cytochrome P4503A and MDR1 by St John's wort in healthy subjects." Clin Pharmacol Ther **73**(1): 41-50.
- Eckford, P. D. and F. J. Sharom (2009). "ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs." Chem Rev **109**(7): 2989-3011.
- Engman, H. (2003). Intestinal Barriers to Oral Drug Absorption - Cytochrome P450 3 A and ABC-Transport Proteins. Doctor Degree, Uppsala University.
- Evers, R., M. de Haas, R. Sparidans, J. Beijnen, P. R. Wielinga, J. Lankelma and P. Borst (2000). "Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export." Br J Cancer **83**(3): 375-383.
- Fagerholm, U. and H. Lennernäs (1995). "Experimental estimation of the effective unstirred water layer thickness in the human jejunum, and its importance in oral drug absorption." European Journal of Pharmaceutical Sciences **3**(5): 247-253.
- Fardel, O., V. Lecureur, S. Daval, A. Corlu and A. Guillouzo (1997). "Up-regulation of P-glycoprotein expression in rat liver cells by acute doxorubicin treatment." Eur J Biochem **246**(1): 186-192.
- Fellner, S., B. Bauer, D. S. Miller, M. Schaffrik, M. Fankhänel, T. Spruß, G. Bernhardt, C. Graeff, L. Färber, H. Gschaidmeier, A. Buschauer and G. Fricker (2002). "Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo." The Journal of Clinical Investigation **110**(9): 1309-1318.

- Ferreira, A. F. P. (2014). Estudo da Glicoproteína-P em linfócitos T humanos e em plasma de ratos Charles Rivers usando a TX5 como potencial indutor da sua expressão e actividade. Master's, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- Fogh, J. (1975). New Human Tumor Cell Lines Human Tumor Cells in Vitro, Springer Science: 26.
- Fojo, A. T., K. Ueda, D. J. Slamon, D. G. Poplack, M. M. Gottesman and I. Pastan (1987). "Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(1): 265-269.
- Fricker, G. and D. S. Miller (2004). "Modulation of drug transporters at the blood-brain barrier." Pharmacology **70**(4): 169-176.
- Fromm, M. F., H. M. Kauffmann, P. Fritz, O. Burk, H. K. Kroemer, R. W. Warzok, M. Eichelbaum, W. Siegmund and D. Schrenk (2000). "The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters." Am J Pathol **157**(5): 1575-1580.
- Gaillard, P. J., L. H. Voorwinden, J. L. Nielsen, A. Ivanov, R. Atsumi, H. Engman, C. Ringbom, A. G. de Boer and D. D. Breimer (2001). "Establishment and functional characterization of an in vitro model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes." Eur J Pharm Sci **12**(3): 215-222.
- Garner, C. and P. D. Brown (1992). "Two types of chloride channel in the apical membrane of rat choroid plexus epithelial cells." Brain Res **591**(1): 137-145.
- Gerrard, G., E. Payne, R. J. Baker, D. T. Jones, M. Potter, H. G. Prentice, M. Ethell, H. McCullough, M. Burgess, A. B. Mehta and K. Ganeshaguru (2004). "Clinical effects and P-glycoprotein inhibition in patients with acute myeloid leukemia treated with zosuquidar trihydrochloride, daunorubicin and cytarabine." Haematologica **89**(7): 782-790.
- Gherzi-Egea, J. F. and N. Strazielle (2001). "Brain drug delivery, drug metabolism, and multidrug resistance at the choroid plexus." Microsc Res Tech **52**(1): 83-88.
- Girardin, F. (2006). "Membrane transporter proteins: a challenge for CNS drug development." Dialogues Clin Neurosci **8**(3): 311-321.
- Gottesman, M. M., T. Fojo and S. E. Bates (2002). "Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters." Nat Rev Cancer **2**(1): 48-58.
- Gottesman, M. M., C. A. Hrycyna, P. V. Schoenlein, U. A. Germann and I. Pastan (1995). "Genetic analysis of the multidrug transporter." Annu Rev Genet **29**: 607-649.
- Graff, C. L. and G. M. Pollack (2004). "Drug transport at the blood-brain barrier and the choroid plexus." Curr Drug Metab **5**(1): 95-108.

- Greiner, B., M. Eichelbaum, P. Fritz, H. P. Kreichgauer, O. von Richter, J. Zundler and H. K. Kroemer (1999). "The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin." J Clin Invest **104**(2): 147-153.
- Groschwitz, K. R. and S. P. Hogan (2009). "Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis." J Allergy Clin Immunol **124**(1): 3-20; quiz 21-22.
- Grosjean, F., M. Bertschinger, D. L. Hacker and F. M. Wurm (2006). "Multiple glycerol shocks increase the calcium phosphate transfection of non-synchronized CHO cells." Biotechnol Lett **28**(22): 1827-1833.
- Grundemann, D., B. Schechinger, G. A. Rappold and E. Schomig (1998). "Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter." Nat Neurosci **1**(5): 349-351.
- Hartz, A. M., D. S. Miller and B. Bauer (2010). "Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid-beta in a mouse model of Alzheimer's disease." Mol Pharmacol **77**(5): 715-723.
- He, S. M., R. Li, J. R. Kanwar and S. F. Zhou (2011). "Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1)." Curr Med Chem **18**(3): 439-481.
- Hidalgo, I. J., T. J. Raub and R. T. Borchardt (1989). "Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability." Gastroenterology **96**(3): 736-749.
- Higgins, C. F. (2007). "Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters." Nature **446**(7137): 749-757.
- Higgins, C. F. and K. J. Linton (2004). "The ATP switch model for ABC transporters." Nat Struct Mol Biol **11**(10): 918-926.
- Hoffmeyer, S., O. Burk, O. von Richter, H. P. Arnold, J. Brockmoller, A. John, I. Cascorbi, T. Gerloff, I. Roots, M. Eichelbaum and U. Brinkmann (2000). "Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3473-3478.
- Hori, R., N. Okamura, T. Aiba and Y. Tanigawara (1993). "Role of P-glycoprotein in renal tubular secretion of digoxin in the isolated perfused rat kidney." J Pharmacol Exp Ther **266**(3): 1620-1625.
- Hunter, J., M. A. Jepson, T. Tsuruo, N. L. Simmons and B. H. Hirst (1993). "Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators." J Biol Chem **268**(20): 14991-14997.

- Huwyler, J., J. Drewe, C. Klusemann and G. Fricker (1996). "Evidence for P-glycoprotein-modulated penetration of morphine-6-glucuronide into brain capillary endothelium." Br J Pharmacol **118**(8): 1879-1885.
- Hyde, S. C., P. Emsley, M. J. Hartshorn, M. M. Mimmack, U. Gileadi, S. R. Pearce, M. P. Gallagher, D. R. Gill, R. E. Hubbard and C. F. Higgins (1990). "Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport." Nature **346**(6282): 362-365.
- Iizuka, M. and S. Konno (2011). "Wound healing of intestinal epithelial cells." World J Gastroenterol **17**(17): 2161-2171.
- Inui, K. I., S. Masuda and H. Saito (2000). "Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney." Kidney Int **58**(3): 944-958.
- Ito, S., G. Koren, P. A. Harper and M. Silverman (1993). "Energy-dependent transport of digoxin across renal tubular cell monolayers (LLC-PK1)." Can J Physiol Pharmacol **71**(1): 40-47.
- Janzer, R. C. and M. C. Raff (1987). "Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells." Nature **325**(6101): 253-257.
- Jette, L., B. Tetu and R. Beliveau (1993). "High levels of P-glycoprotein detected in isolated brain capillaries." Biochim Biophys Acta **1150**(2): 147-154.
- Jodoin, J., M. Demeule, L. Fenart, R. Cecchelli, S. Farmer, K. J. Linton, C. F. Higgins and R. Beliveau (2003). "P-glycoprotein in blood-brain barrier endothelial cells: interaction and oligomerization with caveolins." J Neurochem **87**(4): 1010-1023.
- Johanson, C. E., S. M. Sweeney, J. T. Parmelee and M. H. Epstein (1990). "Cotransport of sodium and chloride by the adult mammalian choroid plexus." Am J Physiol **258**(2 Pt 1): C211-216.
- Jones, P. M. and A. M. George (2004). "The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research." Cell Mol Life Sci **61**(6): 682-699.
- Jonker, J. W., M. Buitelaar, E. Wagenaar, M. A. Van Der Valk, G. L. Scheffer, R. J. Scheper, T. Plosch, F. Kuipers, R. P. Elferink, H. Rosing, J. H. Beijnen and A. H. Schinkel (2002). "The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15649-15654.
- Jonker, J. W., G. Merino, S. Musters, A. E. van Herwaarden, E. Bolscher, E. Wagenaar, E. Mesman, T. C. Dale and A. H. Schinkel (2005). "The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk." Nat Med **11**(2): 127-129.
- Jonker, J. W., J. W. Smit, R. F. Brinkhuis, M. Maliapaard, J. H. Beijnen, J. H. Schellens and A. H. Schinkel (2000). "Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan." J Natl Cancer Inst **92**(20): 1651-1656.

- Karlsson, J., A. Ungell, J. Grasjo and P. Artursson (1999). "Paracellular drug transport across intestinal epithelia: influence of charge and induced water flux." Eur J Pharm Sci **9**(1): 47-56.
- Kekuda, R., P. D. Prasad, X. Wu, H. Wang, Y. J. Fei, F. H. Leibach and V. Ganapathy (1998). "Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta." J Biol Chem **273**(26): 15971-15979.
- Kim, K. A., P. W. Park, K. H. Liu, K. B. Kim, H. J. Lee, J. G. Shin and J. Y. Park (2008). "Effect of rifampin, an inducer of CYP3A and P-glycoprotein, on the pharmacokinetics of risperidone." J Clin Pharmacol **48**(1): 66-72.
- Kivisto, K. T., M. Niemi and M. F. Fromm (2004). "Functional interaction of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein." Fundam Clin Pharmacol **18**(6): 621-626.
- Kobayashi, D., T. Nozawa, K. Imai, J. Nezu, A. Tsuji and I. Tamai (2003). "Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane." J Pharmacol Exp Ther **306**(2): 703-708.
- Kock, K., M. Grube, G. Jedlitschky, L. Oevermann, W. Siegmund, C. A. Ritter and H. K. Kroemer (2007). "Expression of adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) drug transporters in peripheral blood cells: relevance for physiology and pharmacotherapy." Clin Pharmacokinet **46**(6): 449-470.
- Kolars, J. C., K. S. Lown, P. Schmiedlin-Ren, M. Ghosh, C. Fang, S. A. Wrighton, R. M. Merion and P. B. Watkins (1994). "CYP3A gene expression in human gut epithelium." Pharmacogenetics **4**(5): 247-259.
- Krizbai, I., G. Szabo, M. Deli, K. Maderspach, C. Lehel, Z. Olah, J. R. Wolff and F. Joo (1995). "Expression of protein kinase C family members in the cerebral endothelial cells." J Neurochem **65**(1): 459-462.
- Kullak-Ublick, G. A., M. G. Ismail, B. Stieger, L. Landmann, R. Huber, F. Pizzagalli, K. Fattinger, P. J. Meier and B. Hagenbuch (2001). "Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver." Gastroenterology **120**(2): 525-533.
- Kuppens, I. E., E. O. Witteveen, R. C. Jewell, S. A. Radema, E. M. Paul, S. G. Mangum, J. H. Beijnen, E. E. Voest and J. H. Schellens (2007). "A phase I, randomized, open-label, parallel-cohort, dose-finding study of elacridar (GF120918) and oral topotecan in cancer patients." Clin Cancer Res **13**(11): 3276-3285.
- Kusuhara, H. and Y. Sugiyama (2007). "ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family)." Pflugers Arch **453**(5): 735-744.

- Lai, C. H., K. H. Kuo and J. M. Leo (2005). "Critical role of actin in modulating BBB permeability." Brain Res Brain Res Rev **50**(1): 7-13.
- Lee, G. and R. Bendayan (2004). "Functional expression and localization of P-glycoprotein in the central nervous system: relevance to the pathogenesis and treatment of neurological disorders." Pharm Res **21**(8): 1313-1330.
- Lee, G., S. Dallas, M. Hong and R. Bendayan (2001). "Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations." Pharmacol Rev **53**(4): 569-596.
- Lee, G., L. Schlichter, M. Bendayan and R. Bendayan (2001). "Functional expression of P-glycoprotein in rat brain microglia." J Pharmacol Exp Ther **299**(1): 204-212.
- Lee, Y. J., H. Kusuvara, J. W. Jonker, A. H. Schinkel and Y. Sugiyama (2005). "Investigation of efflux transport of dehydroepiandrosterone sulfate and mitoxantrone at the mouse blood-brain barrier: a minor role of breast cancer resistance protein." J Pharmacol Exp Ther **312**(1): 44-52.
- Leggas, M., M. Adachi, G. L. Scheffer, D. Sun, P. Wielinga, G. Du, K. E. Mercer, Y. Zhuang, J. C. Panetta, B. Johnston, R. J. Scheper, C. F. Stewart and J. D. Schuetz (2004). "Mrp4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy." Mol Cell Biol **24**(17): 7612-7621.
- Leslie, E. M., R. G. Deeley and S. P. Cole (2005). "Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense." Toxicol Appl Pharmacol **204**(3): 216-237.
- Li, W. and M. Ehrich (2013). "Transient alterations of the blood-brain barrier tight junction and receptor potential channel gene expression by chlorpyrifos." J Appl Toxicol **33**(10): 1187-1191.
- Lin, J. H. (2003). "Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein." Adv Drug Deliv Rev **55**(1): 53-81.
- Lin, J. H. and M. Yamazaki (2003). "Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications." Clin Pharmacokinet **42**(1): 59-98.
- Lodish H, B. A., Zipursky SL, et al. (2000). Transport across Epithelia. Molecular Cell Biology. New York, W. H. Freeman.
- Lomovskaya, O. and K. A. Bostian (2006). "Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use." Biochem Pharmacol **71**(7): 910-918.
- Lomovskaya, O., H. I. Zgurskaya, M. Totrov and W. J. Watkins (2007). "Waltzing transporters and 'the dance macabre' between humans and bacteria." Nat Rev Drug Discov **6**(1): 56-65.
- Löscher, W. and H. Potschka (2005). "Blood-Brain Barrier Active Efflux Transporters: ATP-Binding Cassette Gene Family." NeuroRx **2**(1): 86-98.

- Lucie Couture, J. A. N. a. J. T. (2007). Role of ATP-binding cassette transporters in drug distribution to the heart and protection from toxic compounds, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, and Charles River Laboratories Preclinical Services, Montreal, Senneville, Québec, Canada: 6.
- Mahringer, A., M. Ott, I. Reimold, V. Reichel and G. Fricker (2011). "The ABC of the blood-brain barrier - regulation of drug efflux pumps." Curr Pharm Des **17**(26): 2762-2770.
- Maliepaard, M., G. L. Scheffer, I. F. Faneyte, M. A. van Gastelen, A. C. Pijnenborg, A. H. Schinkel, M. J. van De Vijver, R. J. Scheper and J. H. Schellens (2001). "Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues." Cancer Res **61**(8): 3458-3464.
- Malingre, M. M., J. H. Beijnen, H. Rosing, F. J. Koopman, R. C. Jewell, E. M. Paul, W. W. Ten Bokkel Huinink and J. H. Schellens (2001). "Co-administration of GF120918 significantly increases the systemic exposure to oral paclitaxel in cancer patients." Br J Cancer **84**(1): 42-47.
- Manceau, S., C. Giraud, X. Decleves, F. Batteux, C. Chereau, S. Chouzenoux, J. M. Scherrmann, B. Weill, J. Y. Perrot and J. M. Treluyer (2012). "Expression and induction by dexamethasone of ABC transporters and nuclear receptors in a human T-lymphocyte cell line." J Chemother **24**(1): 48-55.
- Martin, C. M., A. P. Meeson, S. M. Robertson, T. J. Hawke, J. A. Richardson, S. Bates, S. C. Goetsch, T. D. Gallardo and D. J. Garry (2004). "Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart." Dev Biol **265**(1): 262-275.
- Masereeuw, R., S. Notenboom, P. H. Smeets, A. C. Wouterse and F. G. Russel (2003). "Impaired renal secretion of substrates for the multidrug resistance protein 2 in mutant transport-deficient (TR-) rats." J Am Soc Nephrol **14**(11): 2741-2749.
- Masters, K. S. and S. Brase (2012). "Xanthonenes from fungi, lichens, and bacteria: the natural products and their synthesis." Chem Rev **112**(7): 3717-3776.
- Mealey, K. L. (2004). "Therapeutic implications of the MDR-1 gene." J Vet Pharmacol Ther **27**(5): 257-264.
- Meissner, K., B. Heydrich, G. Jedlitschky, H. Meyer Zu Schwabedissen, I. Mosyagin, P. Dazert, L. Eckel, S. Vogelgesang, R. W. Warzok, M. Bohm, C. Lehmann, M. Wendt, I. Cascorbi and H. K. Kroemer (2006). "The ATP-binding cassette transporter ABCG2 (BCRP), a marker for side population stem cells, is expressed in human heart." J Histochem Cytochem **54**(2): 215-221.
- Mengwasser, J. H. (2011). Lead compounds from nature: Synthesis of natural xanthonenes and chroman aldehydes that inhibit HIV-1. Doctor, Iowa State University.

- Miller, D. S. (2010). "Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier." Trends Pharmacol Sci **31**(6): 246-254.
- Miller, D. S., B. Bauer and A. M. Hartz (2008). "Modulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: opportunities to improve central nervous system pharmacotherapy." Pharmacol Rev **60**(2): 196-209.
- Miller, D. S., S. N. Nobmann, H. Gutmann, M. Toeroek, J. Drewe and G. Fricker (2000). "Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy." Mol Pharmacol **58**(6): 1357-1367.
- Moise Pinto, S. R.-L., Marie-Dominique Appay, Michèle Keding, Nicole Triadou, Elisabeth Dussaulx, Brigitte Lacroix, Patria Simon-Assman, Katy Haffen, Jorgen Fogh, Alain Zweibaum (1983). "Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture " Biology of The Cell: 7.
- Mori, S., H. Takanaga, S. Ohtsuki, T. Deguchi, Y. S. Kang, K. Hosoya and T. Terasaki (2003). "Rat organic anion transporter 3 (rOAT3) is responsible for brain-to-blood efflux of homovanillic acid at the abluminal membrane of brain capillary endothelial cells." J Cereb Blood Flow Metab **23**(4): 432-440.
- Morris, G. Y. M. E. (2007). Overview of Drug Transporter Families. Drug transporters : molecular characterization and role in drug disposition, Hoboken, N.J. : Wiley-Interscience, c2007.: 1 - 10.
- Nakagawa, S., M. A. Deli, H. Kawaguchi, T. Shimizudani, T. Shimono, A. Kittel, K. Tanaka and M. Niwa (2009). "A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes." Neurochem Int **54**(3-4): 253-263.
- Narang, V. S., C. Fraga, N. Kumar, J. Shen, S. Throm, C. F. Stewart and C. M. Waters (2008). "Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the rat blood-brain barrier." Am J Physiol Cell Physiol **295**(2): C440-450.
- Nies, A. T., G. Jedlitschky, J. König, C. Herold-Mende, H. H. Steiner, H. P. Schmitt and D. Keppler (2004). "Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain." Neuroscience **129**(2): 349-360.
- Pageot, L. P., N. Perreault, N. Basora, C. Francoeur, P. Magny and J. F. Beaulieu (2000). "Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis." Microsc Res Tech **49**(4): 394-406.
- Paine, M. F., M. Khalighi, J. M. Fisher, D. D. Shen, K. L. Kunze, C. L. Marsh, J. D. Perkins and K. E. Thummel (1997). "Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism." J Pharmacol Exp Ther **283**(3): 1552-1562.

- Palmeira, A., M. H. Vasconcelos, A. Paiva, M. X. Fernandes, M. Pinto and E. Sousa (2012). "Dual inhibitors of P-glycoprotein and tumor cell growth: (re)discovering thioxanthenes." Biochem Pharmacol **83**(1): 57-68.
- Pan, L. and S. G. Aller (2015). "Equilibrated atomic models of outward-facing P-glycoprotein and effect of ATP binding on structural dynamics." Sci Rep **5**: 7880.
- Patrick T. Ronaldson, K. B. a. R. B. (2007). Drug Transport in the Brain. Drug transporters - Molecular Characterization and Role in Drug Disposition, Hoboken, N.J. : Wiley-Interscience, c2007.: 50.
- Pauwels, E. K., P. Erba, G. Mariani and C. M. Gomes (2007). "Multidrug resistance in cancer: its mechanism and its modulation." Drug News Perspect **20**(6): 371-377.
- Ponte-Sucre, A. (2007). "Availability and applications of ATP-binding cassette (ABC) transporter blockers." Appl Microbiol Biotechnol **76**(2): 279-286.
- Rao, V. V., J. L. Dahlheimer, M. E. Bardgett, A. Z. Snyder, R. A. Finch, A. C. Sartorelli and D. Piwnica-Worms (1999). "Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood–cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(7): 3900-3905.
- Reese, T. S. and M. J. Karnovsky (1967). "Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase." J Cell Biol **34**(1): 207-217.
- Ronaldson, P. T., M. Bendayan, D. Gingras, M. Piquette-Miller and R. Bendayan (2004). "Cellular localization and functional expression of P-glycoprotein in rat astrocyte cultures." J Neurochem **89**(3): 788-800.
- Roux, F. and P. O. Couraud (2005). "Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions." Cell Mol Neurobiol **25**(1): 41-58.
- Ruetz, S. and P. Gros (1994). "Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene." Cell **77**(7): 1071-1081.
- Russel, F. G. M. (2010). Transporters: Importance in Drug Absorption, Distribution, and Removal. Enzyme- and Transporter-Based Drug-Drug Interactions, Springer: 22.
- Sambuy, Y., I. De Angelis, G. Ranaldi, M. L. Scarino, A. Stamatii and F. Zucco (2005). "The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics." Cell Biol Toxicol **21**(1): 1-26.
- Sarkadi, B., L. Homolya, G. Szakacs and A. Varadi (2006). "Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system." Physiol Rev **86**(4): 1179-1236.

- Schaub, T. P., J. Kartenbeck, J. König, H. Spring, J. Dorsam, G. Staehler, S. Storkel, W. F. Thon and D. Keppler (1999). "Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma." J Am Soc Nephrol **10**(6): 1159-1169.
- Schinkel, A. H. (1997). "The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins." Semin Cancer Biol **8**(3): 161-170.
- Schinkel, A. H., J. J. Smit, O. van Tellingen, J. H. Beijnen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C. A. Mol, M. A. van der Valk, E. C. Robanus-Maandag, H. P. te Riele and et al. (1994). "Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs." Cell **77**(4): 491-502.
- Schinkel, A. H., E. Wagenaar, L. van Deemter, C. A. Mol and P. Borst (1995). "Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A." J Clin Invest **96**(4): 1698-1705.
- Seelig, A. (1998). "A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein." Eur J Biochem **251**(1-2): 252-261.
- Seelig, A. and E. Landwojtowicz (2000). "Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers." Eur J Pharm Sci **12**(1): 31-40.
- Segal, M. B. (2000). "The choroid plexuses and the barriers between the blood and the cerebrospinal fluid." Cell Mol Neurobiol **20**(2): 183-196.
- Shapiro, A. B. and V. Ling (1997). "Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities." Eur J Biochem **250**(1): 130-137.
- Shapiro, L. E. and N. H. Shear (2002). "Drug interactions: Proteins, pumps, and P-450s." J Am Acad Dermatol **47**(4): 467-484; quiz 485-468.
- Sharom, F. J. (2007). Multidrug Resistance Protein: P-Glycoprotein. Drug Transporters, Hoboken, N.J. : Wiley-Interscience, c2007.: 223-262.
- Sharom, F. J. (2011). "The P-glycoprotein multidrug transporter." Essays Biochem **50**(1): 161-178.
- Silva, R., H. Carmo, R. Dinis-Oliveira, A. Cordeiro-da-Silva, S. C. Lima, F. Carvalho, L. Bastos Mde and F. Remiao (2011). "In vitro study of P-glycoprotein induction as an antidotal pathway to prevent cytotoxicity in Caco-2 cells." Arch Toxicol **85**(4): 315-326.
- Silva, R., H. Carmo, V. Vilas-Boas, P. G. de Pinho, R. J. Dinis-Oliveira, F. Carvalho, I. Silva, P. Correia-de-Sa, L. Bastos Mde and F. Remiao (2013). "Doxorubicin decreases paraquat accumulation and toxicity in Caco-2 cells." Toxicol Lett **217**(1): 34-41.
- Silva, R., A. Palmeira, H. Carmo, D. J. Barbosa, M. Gameiro, A. Gomes, A. M. Paiva, E. Sousa, M. Pinto, L. Bastos Mde and F. Remiao (2015). "P-glycoprotein induction in Caco-2 cells by newly synthesized thioxanthenes prevents paraquat cytotoxicity." Arch Toxicol **89**(10): 1783-1800.

- Silva, R., E. Sousa, H. Carmo, A. Palmeira, D. J. Barbosa, M. Gameiro, M. Pinto, L. Bastos Mde and F. Remiao (2014). "Induction and activation of P-glycoprotein by dihydroxylated xanthenes protect against the cytotoxicity of the P-glycoprotein substrate paraquat." Arch Toxicol **88**(4): 937-951.
- Silva, R., V. Vilas-Boas, H. Carmo, R. J. Dinis-Oliveira, F. Carvalho, M. de Lourdes Bastos and F. Remiao (2015). "Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy." Pharmacol Ther **149**: 1-123.
- Sinko, Y. S. P. J. (2007). Drug Transporters in the Intestine. Drug transporters - Molecular Characterization and Role in Drug Disposition, Hoboken, N.J. : Wiley-Interscience, c2007.: 20.
- Smith, J. P. and L. R. Drewes (2006). "Modulation of monocarboxylic acid transporter-1 kinetic function by the cAMP signaling pathway in rat brain endothelial cells." J Biol Chem **281**(4): 2053-2060.
- Solbach, T. F., J. Konig, M. F. Fromm and O. Zolk (2006). "ATP-binding cassette transporters in the heart." Trends Cardiovasc Med **16**(1): 7-15.
- Sousa, E., A. Palmeira, A. Cordeiro, B. Sarmiento, D. Ferreira, R. Lima, M. Helena Vasconcelos and M. Pinto (2013). "Bioactive xanthenes with effect on P-glycoprotein and prediction of intestinal absorption." Medicinal Chemistry Research **22**(5): 2115-2123.
- Strazielle, N., S. T. Khuth and J. F. Gherzi-Egea (2004). "Detoxification systems, passive and specific transport for drugs at the blood-CSF barrier in normal and pathological situations." Adv Drug Deliv Rev **56**(12): 1717-1740.
- Tada, Y., M. Wada, K. Kuroiwa, N. Kinugawa, T. Harada, J. Nagayama, M. Nakagawa, S. Naito and M. Kuwano (2000). "MDR1 gene overexpression and altered degree of methylation at the promoter region in bladder cancer during chemotherapeutic treatment." Clin Cancer Res **6**(12): 4618-4627.
- Takara, K., M. Tsujimoto, M. Kokufu, N. Ohnishi and T. Yokoyama (2003). "Up-regulation of MDR1 function and expression by cisplatin in LLC-PK1 cells." Biol Pharm Bull **26**(2): 205-209.
- Taylor, E. M. (2002). "The impact of efflux transporters in the brain on the development of drugs for CNS disorders." Clin Pharmacokinet **41**(2): 81-92.
- Tchamo, D. N., M. G. Dijoux-Franca, A. M. Mariotte, E. Tsamo, J. B. Daskiewicz, C. Bayet, D. Barron, G. Conseil and A. Di Pietro (2000). "Prenylated xanthenes as potential P-glycoprotein modulators." Bioorg Med Chem Lett **10**(12): 1343-1345.
- ten Hove, T., P. Drillenburger, J. Wijnholds, A. A. Te Velde and S. J. van Deventer (2002). "Differential susceptibility of multidrug resistance protein-1 deficient mice to DSS and TNBS-induced colitis." Dig Dis Sci **47**(9): 2056-2063.

- Thiebaut, F., T. Tsuruo, H. Hamada, M. M. Gottesman, I. Pastan and M. C. Willingham (1987). "Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7735-7738.
- Tian, R., N. Koyabu, S. Morimoto, Y. Shoyama, H. Ohtani and Y. Sawada (2005). "Functional induction and de-induction of P-glycoprotein by St. John's wort and its ingredients in a human colon adenocarcinoma cell line." Drug Metab Dispos **33**(4): 547-554.
- Ullah, M. F. (2008). "Cancer multidrug resistance (MDR): a major impediment to effective chemotherapy." Asian Pac J Cancer Prev **9**(1): 1-6.
- van Asperen, J., O. van Tellingen, A. Sparreboom, A. H. Schinkel, P. Borst, W. J. Nooijen and J. H. Beijnen (1997). "Enhanced oral bioavailability of paclitaxel in mice treated with the P-glycoprotein blocker SDZ PSC 833." Br J Cancer **76**(9): 1181-1183.
- van Herwaarden, A. E. and A. H. Schinkel (2006). "The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins." Trends Pharmacol Sci **27**(1): 10-16.
- van Zuylen, L., J. Verweij, K. Nooter, E. Brouwer, G. Stoter and A. Sparreboom (2000). "Role of intestinal P-glycoprotein in the plasma and fecal disposition of docetaxel in humans." Clin Cancer Res **6**(7): 2598-2603.
- Varma, M. V., Y. Ashokraj, C. S. Dey and R. Panchagnula (2003). "P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement." Pharmacol Res **48**(4): 347-359.
- Vilas-Boas, V., R. Silva, A. R. Gaio, A. M. Martins, S. C. Lima, A. Cordeiro-da-Silva, M. de Lourdes Bastos and F. Remiao (2011). "P-glycoprotein activity in human Caucasian male lymphocytes does not follow its increased expression during aging." Cytometry A **79**(11): 912-919.
- von Richter, O., O. Burk, M. F. Fromm, K. P. Thon, M. Eichelbaum and K. T. Kivisto (2004). "Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens." Clin Pharmacol Ther **75**(3): 172-183.
- von Richter, O., B. Greiner, M. F. Fromm, R. Fraser, T. Omari, M. L. Barclay, J. Dent, A. A. Somogyi and M. Eichelbaum (2001). "Determination of in vivo absorption, metabolism, and transport of drugs by the human intestinal wall and liver with a novel perfusion technique." Clin Pharmacol Ther **70**(3): 217-227.
- Wacher, V. J., C. Y. Wu and L. Z. Benet (1995). "Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy." Mol Carcinog **13**(3): 129-134.

- Wang, R. B., C. L. Kuo, L. L. Lien and E. J. Lien (2003). "Structure-activity relationship: analyses of p-glycoprotein substrates and inhibitors." J Clin Pharm Ther **28**(3): 203-228.
- Werle, M. (2008). "Natural and synthetic polymers as inhibitors of drug efflux pumps." Pharm Res **25**(3): 500-511.
- Wessler, J. D., L. T. Grip, J. Mendell and R. P. Giugliano (2013). "The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs." J Am Coll Cardiol **61**(25): 2495-2502.
- Williams, J. A., J. Bauman, H. Cai, K. Conlon, S. Hansel, S. Hurst, N. Sadagopan, M. Tugnait, L. Zhang and J. Sahi (2005). "In vitro ADME phenotyping in drug discovery: current challenges and future solutions." Curr Opin Drug Discov Devel **8**(1): 78-88.
- Xia, C. Q., G. Xiao, N. Liu, S. Pimprale, L. Fox, C. J. Patten, C. L. Crespi, G. Miwa and L. S. Gan (2006). "Comparison of species differences of P-glycoproteins in beagle dog, rhesus monkey, and human using Atpase activity assays." Mol Pharm **3**(1): 78-86.
- Yoshida, K., K. Maeda and Y. Sugiyama (2013). "Hepatic and intestinal drug transporters: prediction of pharmacokinetic effects caused by drug-drug interactions and genetic polymorphisms." Annu Rev Pharmacol Toxicol **53**: 581-612.
- Yu, X. Y., S. G. Lin, Z. W. Zhou, X. Chen, J. Liang, X. Q. Yu, B. Chowbay, J. Y. Wen, W. Duan, E. Chan, X. T. Li, J. Cao, C. G. Li, C. C. Xue and S. F. Zhou (2007). "Role of P-glycoprotein in limiting the brain penetration of glabridin, an active isoflavan from the root of *Glycyrrhiza glabra*." Pharm Res **24**(9): 1668-1690.
- Zhang, Y., C. Bachmeier and D. W. Miller (2003). "In vitro and in vivo models for assessing drug efflux transporter activity." Adv Drug Deliv Rev **55**(1): 31-51.
- Zhang, Y., H. Han, W. F. Elmquist and D. W. Miller (2000). "Expression of various multidrug resistance-associated protein (MRP) homologues in brain microvessel endothelial cells." Brain Res **876**(1-2): 148-153.
- Zhao, J. and R. C. Larock (2007). "Synthesis of Xanthenes, Thioxanthenes and Acridones by the Coupling of Arynes and Substituted Benzoates." The Journal of organic chemistry **72**(2): 583-588.
- Zhou, S. F. (2008). "Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition." Xenobiotica **38**(7-8): 802-832.